

Papel del complejo Ccr4-Not en la respuesta a estrés mediada por la MAPK Spc1 en *Schizosaccharomyces pombe*

Marina Portantier

Madrid, 2013
Departamento de Biología Molecular
Facultad de Ciencias
Universidad Autónoma de Madrid



FACULTAD DE
CIENCIAS



Universidad Autónoma de Madrid
Facultad de Ciencias
Departamento de Biología Molecular



Papel del complejo Ccr4-Not en la respuesta a estrés mediada por la MAPK Spc1 en *Schizosaccharomyces pombe*

Memoria presentada por
Marina Portantier
para optar al grado de Doctor en Ciencias

Director: Miguel Ángel Rodríguez Gabriel
Centro de Biología Molecular Severo Ochoa

Esta Tesis Doctoral ha sido posible gracias a las siguientes ayudas:

- Beca de formación de personal investigador (FPI) de la Universidad Autónoma de Madrid. Octubre 2009-Septiembre 2013.
- Ayudas para estancia breve asociada a la beca FPI de la Universidad Autónoma de Madrid en el laboratorio de la Dra. Elena Hidalgo y José Ayte, Cell Cycle and Oxidative Group, Universidad Pompeu Fabra, Barcelona, España. Marzo-Agosto 2012.

El trabajo descrito ha sido financiado por los siguientes proyectos:

- “Especificidad de señalización en células eucarióticas: MAP quinasas y proteínas de unión a RNA en *Schizosaccharomyces pombe*”. BFU 2009-09116. Ministerio de Ciencia e Innovación.

RESUMEN

MAPK pathways are the principal connection between external stimuli and internal responses in all eukaryotic cells. The Spc1 MAPK pathway, p38 ortholog in mammals, plays an important role in the response to stress in *Schizosaccharomyces pombe*. This pathway has been well studied in fission yeast but there are still open questions about its regulation and especially how the pathway achieves a specific response to a high variety of stimuli.

Upon oxidative stress, the MAPK Spc1 and the RNA binding protein Csx1 present a coordinated response. Looking for candidates that interact with Spc1 and Csx1, we observe that they interact with components of the Ccr4-Not complex in TAP purification assays. This complex has gained importance in the last years because it is thought to be a global regulator of gene expression and it is conserved along all eukaryotes. Most of the studies are from *S. cerevisiae* and higher eukaryotes and little is known in *S. pombe*. In *S. cerevisiae*, Ccr4-Not complex regulates processes like mRNA synthesis, mRNA degradation and protein degradation and interacts with other important cell complexes like SAGA, RNA PolIII, exosome and the proteasome. It is formed by nine core subunits, a Ccr4 group (Ccr4, Caf1/Pop2) involved in deadenylation and a Not group (Not1 (scaffold), Not2, Not3, Not4/Mot2) involved in transcriptional regulation and protein modification, and the RNA binding protein Caf40/Rcd1. Other proteins seem to be part of the complex like Caf4, Caf16, Btf3 and Dhh1/Ste13.

We focus our work in studying the functional and structural link between Ccr4-Not complex and Spc1 MAPK and the Ccr4-Not complex regulation of the Spc1-dependent stress response.

Spc1 associates with the complex through Not1 and the deadenylases Caf1 and Ccr4. Most of the components of the complex are important for the stress response like osmotic and oxidative stress and are necessary for the response to nitrogen starvation. We show that the complex regulates the expression of Spc1-dependent stress genes and that the mechanism seems to be principally at the level of transcription elongation. We speculate a model in which Ccr4-Not complex recruits Spc1 functioning as elongator factors in response to stress.

ABREVIATURAS

Abs	Absorbancia
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN complementario
ARN	Ácido ribonucleico
ARNbp	Proteína de unión a ARN (<i>RNA binding protein</i>)
ARNi	ARN de interferencia
ARNm	ARN mensajero
ARNr	ARN ribosómico
ARNsn	ARN <i>small nuclear</i>
ARNsno	ARN <i>small nucleolar</i>
ARNt	ARN de transferencia
ATP	<i>Adenosine triphosphate</i>
6-AU	6-azauracilo
CESR	Respuesta esencial a estrés ambiental (<i>Core Environmental Stress Response</i>)
Co-IP	copurificación
CRE	<i>cAMP</i> (cyclic adenosine monophosphate) <i>response element</i>
CTD	Dominio carboxilo terminal en ARN PolII
C-terminal	Carboxilo-terminal
EMM	Medio mínimo (<i>Edinburgh minimal media</i>)
EMM-N	Medio mínimo sin nitrógeno (<i>Edinburgh minimal media without nitrogen</i>)
IP	Inmunopurificación
JNK	Kinasa del amino terminal cJun (<i>cJun N-terminal kinase</i>)
KAN	Kanamicina
MAPK	Proteína kinasa activada por mitógeno (<i>mitogen activated protein kinase</i>)
MAPKAP	Proteína kinasa activada por MAPK (<i>MAP kinase-activated protein kinase</i>)
MAPKK	MAPK kinasa
MAPKKK	MAPKK kinasa
miARN	microARN
MPA	Ácido micofenólico

NAC	Complejo asociado a polipetidos nacientes
NAT	Nourseotricina
NB	Northern Blot
N-terminal	Amino-terminal
ORF	Fase de lectura abierta (<i>Open Reading Frame</i>)
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (<i>Polimerase Chain Reaction</i>)
PCRq	PCR cuantitativa
PolII	ARN polimerasa II
RT-PCRq	Retrotranscriptasa reversa seguida de PCRq
SAGA	Spt-Ada-Gcn5 acetiltransferasa
SESR	Respuesta específica al tipo de estrés ambiental (<i>Specific Environmental Stress Response</i>)
TAF	Factor de asociación a TBP (<i>TBP associated factor</i>)
TAP	<i>Tandem affinity purification</i>
TBP	Proteína de unión a TATA (<i>TATA binding protein</i>)
UV	Ultravioleta
WB	Western Blot
YES	Medio rico (<i>Yeast Extract plus Supplemen</i>)

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN

1.	Vías de MAPKs.....	1
1.1	Vías de respuesta a estrés	1
1.2	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	2
1.3	Vías de MAPK en <i>S. pombe</i>	3
1.4	La vía de respuesta a estrés: la MAPK Spc1	4
1.5	Especificidad de respuesta	5
1.6	Activación de Spc1 y sustratos de la MAPK	6
1.7	Respuesta transcripcional al estrés	7
2.	Transcripción en <i>S. pombe</i>	9
3.	El complejo Ccr4-Not	11
3.1	Composición del complejo.....	11
3.2	Estructura del complejo.....	12
3.3	El complejo está conservado en todos los eucariotas.....	13
3.4	Funciones del complejo.....	15
3.5	El complejo Ccr4-Not se asocia con otras proteínas y complejos celulares	21
3.6	El complejo Ccr4-Not es esencial para la viabilidad de <i>S. cerevisiae</i>	22
3.7	Papel del complejo Ccr4-Not en la respuesta a estrés en <i>S. cerevisiae</i>	23
3.8	Complejo Ccr4-Not en <i>S.pombe</i>	24

OBJETIVOS	25
------------------	----

MATERIALES Y MÉTODOS

1.	Material Biológico.....	26
1.1	Cepas de <i>S. pombe</i>	26
1.2	Cepas de <i>E. coli</i>	28
2.	Plásmidos	28
3.	Oligonucleótidos	29
4.	Medios de cultivo	31
5.	Crecimiento y manipulación de microorganismos.....	31
5.1	Ensayos de viabilidad por dilución en placa	32
5.2	Eficiencia de <i>mating</i>	32
6.	Transformación celular	33
6.1	Transformación de <i>E. coli</i>	33
6.2	Transformación de <i>S. pombe</i>	33
7.	Técnicas genéticas.....	33
7.1	Obtención de cepas por cruce.....	33

7.2	Deleción o epitopado con cassettes de KAN o NAT	34
8.	Técnicas de biología molecular	34
8.1	PCR	34
8.2	Visualización de ácidos nucleicos	34
8.3	Mutagénesis dirigida	34
8.4	Clonación	35
9.	Análisis de ARN.....	35
9.1	Northern Blot	35
9.2	Transcriptasa reversa seguida de PCR cuantitativa (RT-PCRq)	36
10.	Análisis de proteínas	36
10.1	SDS-PAGE y Tinción de plata.....	36
10.2	Western Blot.....	37
10.3	Preparación de extractos proteicos con TCA	37
10.4	Purificación de proteínas	38
10.5	Inmunopurificación de cromatina (ChIP).....	41
10.6	Ensayo kinasa.....	42
11.	Análisis bioinformático	42
11.1	Alineamientos multiples.....	42

RESULTADOS

1.	Interacción de la MAPK Spc1 con el complejo Ccr4-Not	43
1.1	Búsqueda de proteínas que interaccionan con Spc1 y con Csx1	43
1.2	Not1 y el complejo Ccr4-Not está conservado en <i>S. pombe</i>	45
1.3	Spc1 y Not1 se asocian <i>in vivo</i>	47
1.4	Controles de copurificación	47
1.5	La interacción Spc1/Not1 se mantiene en condiciones de estrés	48
1.6	Csx1 y Not1 copurifican en condiciones basales y de estrés	49
1.7	Interacción directa entre Spc1 y Not1	50
1.8	La interacción de Not1 con Spc1 depende de otros componentes del complejo.....	51
2.	Importancia de los componentes del complejo Ccr4-Not en la respuesta a estrés	53
2.1	Ensayos de sensibilidad a estrés osmótico, oxidativo y alta temperatura	53
2.2	Ausencia de nitrógeno: diferenciación sexual.....	55
2.3	Papel del complejo Ccr4-Not en la señalización mediada por Spc1	57
3.	Papel del complejo Ccr4-Not en la regulación transcripcional de respuesta a estrés.....	59
3.1	Respuesta transcripcional en estrés oxidativo y osmótico	59
3.2	Caf1 modifica la inducción de Ste11	61
4.	Asociación de Spc1 con las deadenilasas Ccr4 y Caf1	63
4.1	Caf1 y Ccr4 copurifican con Spc1	63
4.2	La interacción de Not1, Caf1 y Ccr4 con Spc1 no está mediada por ARN.....	64

4.3	Ccr4 y Caf1 interaccionan genéticamente con Spc1 en respuesta a estrés.....	65
4.4	Caf1 modifica la cinética de inducción de genes en respuesta a estrés oxidativo	66
4.5	¿Ccr4 y Caf1 son sustratos de la MAPK Spc1?	68
4.6	La estabilidad de la unión Not1-Caf1-Ccr4 no depende de Spc1	70
5.	Mecanismo del complejo Ccr4-Not en la respuesta transcripcional ante el estrés.....	71
5.1	¿Se une el complejo Ccr4-Not directamente a genes inducidos por estrés?	71
5.2	Caf1 modifica la unión de la ARN polimerasa II a genes de estrés	72
5.3	Rol de Caf1 en la fase de iniciación de la transcripción.....	74
5.4	Rol de Caf1 y Ccr4 en la fase de elongación de la transcripción	74
5.5	Caf1 interacciona genéticamente con Gcn5	78
6.	Papel del complejo Ccr4-Not en la regulación post-traducciona de Spc1	81
7.	Búsqueda de modificaciones post-traduccionales en Spc1	82
7.1	La proteína Spc1 presenta bandas de mayor peso molecular en ensayos de electroforesis	82
7.2	Spc1 está modificada por ubiquitinación en condiciones basales y de estrés	83
7.3	Las subunidades Mts2 y Mts3 del proteasoma no regulan la cantidad de Spc1 ubiquitinada.....	84
7.4	Búsqueda de la ubiquitin ligasa E3 de Spc1.....	85
7.5	Sitio de ubiquitinación de Spc1.....	86

DISCUSIÓN

1.	La MAPK Spc1 y la ARNbp Csx1 interaccionan con Not1 del complejo Ccr4-Not.....	90
2.	Relación de Spc1 con el complejo Ccr4-Not	91
2.1	Interacciones bioquímicas	91
2.2	Relevancia funcional	95
3.	Papel del complejo Ccr4-Not en la respuesta a estrés y la diferenciación sexual	95
3.1	Sensibilidad a estrés oxidativo y osmótico.....	95
3.2	Papel en diferenciación sexual: Ausencia de nitrógeno	96
4.	Respuesta transcripcional a estrés	97
4.1	Desregulación de ste11 en ausencia de nitrógeno	100
5.	¿Cómo está conectado el papel del complejo Ccr4-Not en la respuesta a estrés y diferenciación con la vía de señalización mediada por Spc1?	101
5.1	Estudios de interacción genética	103
5.2	¿El complejo modifica post-traducciona a Spc1?.....	104
6.	Perspectivas a futuro	105

CONCLUSIONES	106
---------------------	-----

BIBLIOGRAFÍA	107
---------------------	-----

INTRODUCCIÓN

1. VÍAS DE MAPKS

Los organismos eucariotas responden a los estímulos externos a través de vías de MAPKs (*Mitogen Activated Protein Kinases*). Estas vías consisten en cascadas de fosforilación en las cuales, luego de un estímulo ambiental, la proteína MAPK es fosforilada por una MAPK kinasa (MAPKK) que ha sido fosforilada por una MAPKK kinasa (MAPKKK). Las MAPKs fosforilan a su vez diferentes factores de transcripción u otras proteínas kinasas (MAPKAP) permitiendo la adaptación al estímulo y responder al cambio en el ambiente. Además de estas cascadas de fosforilación también existen defosforilaciones que son llevadas a cabo por fosfatasa y regulan la intensidad y duración de la señal.

En los organismos multicelulares estas vías son de gran importancia en todas las células para responder a diferentes estímulos como citoquinas, patógenos, factores de crecimiento, radiación ultravioleta (UV), estrés osmótico y varias formas de estrés oxidativo conduciendo a cambios en ciclo celular y expresión génica (Johnson & Lapadat 2002). Las vías de MAPKs, entre otras respuestas, facilitan una respuesta inmune apropiada a los diferentes agentes infecciosos y participan en respuestas inflamatorias inapropiadas, como la artritis reumatoidea y el asma (Jeffrey *et al.* 2007) y en la respuesta a estrés oxidativo asociado al envejecimiento y enfermedades.

1.1 Vías de respuesta a estrés

Los tipos de estrés a los que están expuestas las células de un organismo multicelular o uno unicelular son similares. Entre los estímulos a los que puede estar expuesta una célula se encuentran factores físicos, como son las variaciones del pH, radiación UV, fluctuaciones de temperatura y factores químicos, como la disponibilidad de nutrientes, estrés osmótico, compuestos tóxicos (metales, agentes oxidantes, etc).

Las vías de respuesta a estrés están conservadas en eucariotas. La principal vía de respuesta a estrés es la mediada por las MAPKs: p38/JNK en mamíferos y la mosca de la fruta (*Drosophila melanogaster*), Hog1 en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* y Spc1/Sty1 en la levadura de fisión *Schizosaccharomyces pombe*. En *S. cerevisiae*, la vía de Hog1 responde principalmente a estrés osmótico mientras que en *S. pombe*, Spc1, al igual que p38/JNK de mamíferos responde a una gran variedad de estímulos ambientales como calor, UV, superóxido, peróxido, algunos agentes que generan daños en el DNA y estrés osmótico (Egel 2004; Tibbles & Woodgett 1999) (Fig. 1).

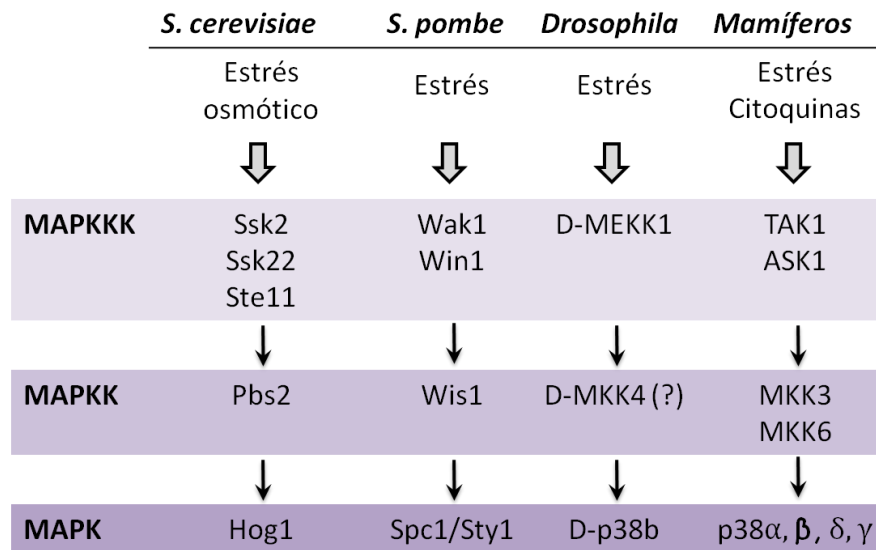


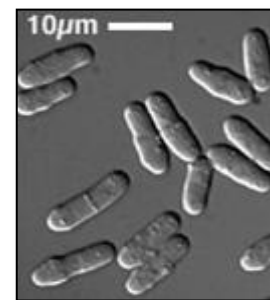
Figura 1. Vías de respuesta a estrés en eucariotas.

S. cerevisiae ha sido la levadura más estudiada y se ha utilizado como organismo modelo para estudiar la respuesta a estrés en eucariotas. Sin embargo, el estudio de *S. pombe* en este tipo de respuestas es complementario debido a que difiere con respecto a *S. cerevisiae* y sin embargo tiene otros aspectos en común con eucariotas superiores como los mamíferos.

1.2 *Schizosaccharomyces pombe*

La levadura de fisión *S. pombe*, es un buen organismo modelo para el estudio de las vías de estrés porque, por un lado presenta las ventajas de ser una levadura (por lo que al igual que *S. cerevisiae* su manipulación en el laboratorio es sencilla); y por otro lado, la vía de respuesta a estrés es similar a la de eucariotas superiores (Sean M. O'Rourke 2002). Las principales razones del uso de *S. pombe* como organismo modelo según (Egel 2004) son:

- su organización unicelular simple, con un ciclo celular y divisiones mitóticas convencionales.
- su fácil manipulación mediante genética clásica y molecular, facilitada por técnicas de cruce sencillas. Además de una meiosis convencional y una amplia variedad de procedimientos para realizar genética reversa.
- se dispone de la secuencia del genoma completo (Wood *et al.* 2002).
- presenta complementación funcional para muchas proteínas de mamíferos.



1.3 Vías de MAPK en *S. pombe*

En la levadura de fisión, la principal cascada de señales de respuesta a estrés esta mediada por la MAPK Spc1, también conocida como Sty1 o Phh1 (Kato *et al.* 1996; Millar *et al.* 1995; Shiozaki & Russell 1995a). Además de la vía de la MAPK Spc1, en *S. pombe* existen otras dos vías de MAPKs, una encargada de mantener la integridad celular mediada por la MAPK Spm1 o Pmk1 y que responde principalmente a daños en la pared celular y otra encargada de la reproducción sexual o diferenciación mediada por Spk1 y que responde a feromonas. Estas vías de MAPKs también detectan los cambios externos para traducir los estímulos en respuestas celulares específicas (Egel 2004) (Fig. 2).

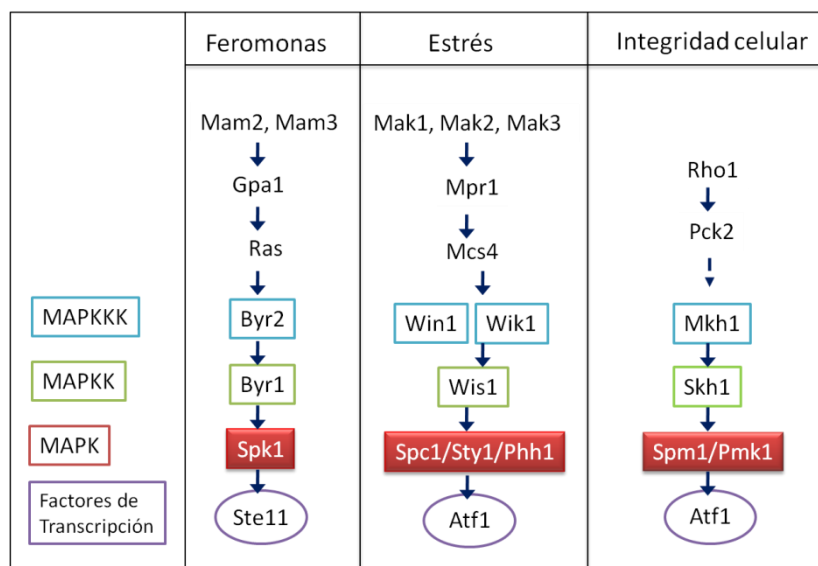


Figura 2. Vías de MAPK en *S. pombe*.

Curiosamente, las tres vías de MAPKs no son vías independientes y aisladas sino que responden a estímulos similares y presentan componentes comunes. La vía de integridad también responde a diferentes tipos de estrés como osmótico, oxidativo, gravedad y choque térmico (Barba *et al.* 2008; Madrid *et al.* 2006; Perez & Rincon 2010; Soto *et al.* 2007) y limitación de glucosa (Madrid *et al.* 2013; Madrid *et al.* 2006). Se ha demostrado que, en condiciones de estrés osmótico, las fosfatasa Pyp1, Pyp2, y Ptc1, Ptc3, cuya expresión es dependiente de Spc1 y Atf1, son también fosfatasa de Pmk1 (Madrid *et al.* 2007). Además, el factor de transcripción Atf1, el principal sustrato activado por la MAPK Spc1, es fosforilado específicamente por Pmk1 en condiciones de daño de pared y regula la expresión de un número limitado de genes (Perez & Rincon 2010; Takada *et al.* 2010). En condiciones de limitación de

glucosa la vía de Pmk1, incrementa la actividad de la vía de Spc1 por un mecanismo dependiente de la transcripción de Atf1 y el aumento en la transmisión de la señal de Spc1 (Madrid *et al.* 2013).

Por otro lado, la vía de respuesta a estrés mediada por Spc1 responde a deficiencia de nutrientes como nitrógeno y regula la diferenciación sexual mediante la regulación de la transcripción de *ste11*, el principal factor de transcripción de la vía mediada por Spk1, por Atf1 (Shiozaki & Russell 1996; Takeda *et al.* 1995).

1.4 La vía de respuesta a estrés: la MAPK Spc1

La vía de señalización mediada por Spc1 responde a múltiples tipos de estrés como el estrés oxidativo, osmótico, radiación UV, metales, nutrientes, etc. La ruta de respuesta a estrés se regula en parte por un sistema de fosforrelevo. El sensor del estímulo es una histidina kinasa como Mak1 (Phk3), Mak2 (Phk1) y Mak3 (Phk2), que fosforilan a Mpr1 (Spy1) y esta a su vez cede el grupo fosfato a Mcs4 (Nguyen *et al.* 2000). Mcs4 es el regulador de la respuesta y actúa sobre la MAPKKK Wis4/Wik1/Wak1 (Shiozaki *et al.* 1997). Luego, las MAPKKKs Wik1 y Win1 activan mediante fosforilación a la MAPKK Wis1 (Samejima *et al.* 1997; Samejima *et al.* 1998) que fosforila y activa a la MAPK Spc1 en los residuos treonina 171 y tirosina 173 (Shiozaki & Russell 1995a).

Las tirosín fosfatasas Pyp1 y Pyp2 y las serín-treonín fosfatasas del tipo 2C (PP2C), Ptc1 y Ptc3, regulan la actividad de la ruta mediante la defosforilación de Spc1. La intensidad y duración de la señal es importante que esté correctamente regulada como se deduce de que la delección conjunta de las fosfatasas Pyp1 y Pyp2 sea letal para la célula (Millar *et al.* 1995; Shiozaki & Russell 1995a).

Los mutantes *spc1Δ* presentan un fenotipo de sensibilidad a múltiples tipos de estrés, y además presentan otros fenotipos como pérdida de viabilidad en fase estacionaria, fallo en la entrada en meiosis luego de la deprivación de nitrógeno y retraso en el tiempo de iniciación de la mitosis y re-entrada en el ciclo de división celular luego del estrés (Shiozaki & Russell 1995a; Wilkinson *et al.* 1996). Por lo tanto a partir de múltiples estímulos se desarrolla una respuesta específica a nivel de la transcripción, el ciclo celular, la fase estacionaria y diferenciación sexual de la célula (Fig. 3).

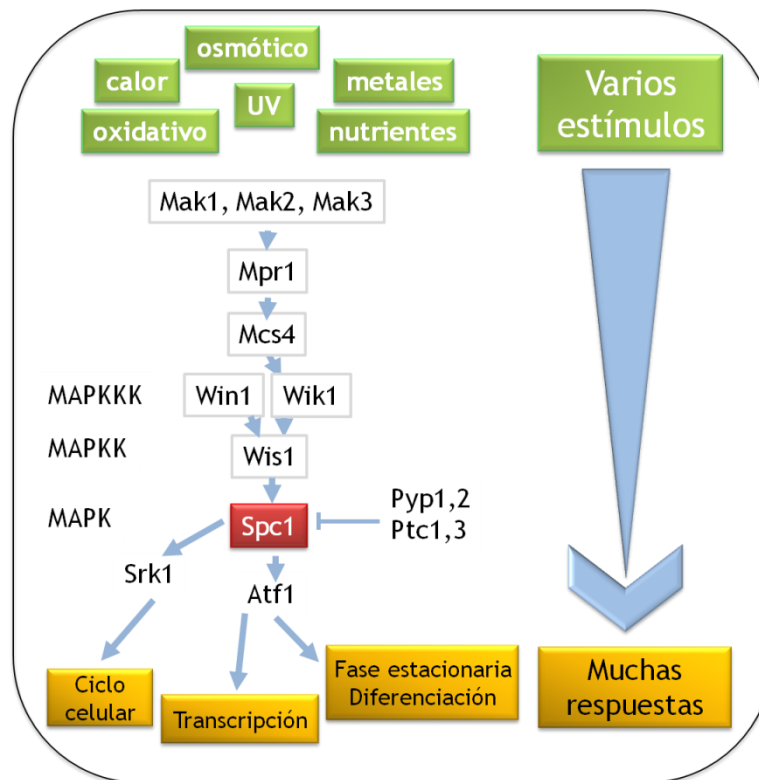


Figura 3. Vía de respuesta a estrés de la MAPK Spc1 en *S. pombe*.

Uno de los interrogantes es cómo se detecta el estrés y cómo una misma vía es capaz de responder a variados estímulos dando una respuesta específica a cada uno.

1.5 Especificidad de respuesta

La vía de la MAPK Spc1 detecta señales específicas mediante varios mecanismos.

En el caso del estrés oxidativo, generado por H_2O_2 , éste se detecta mediante la vía de fosforelevo de dos componentes, aunque la inactivación de la vía no genera sensibilidad a H_2O_2 (Buck *et al.* 2001; Egel 2004; Nguyen *et al.* 2000; Quinn *et al.* 2002; Shieh *et al.* 1997; Shiozaki *et al.* 1997). En estrés oxidativo la respuesta depende de los niveles de estrés y está mediada por dos sistemas de regulación dependientes de los factores de transcripción Pap1 y Atf1. A niveles bajos de estrés oxidativo se requiere a Pap1 y su función principal es la adaptación, mientras que a altas concentraciones de H_2O_2 , Atf1 coordina una función de supervivencia (Nguyen *et al.* 2000; Quinn *et al.* 2002; Vivancos *et al.* 2004). Además, frente a este tipo de estrés, se requiere específicamente de la proteína de unión a ARN (ARNbp), Csx1, que modula la estabilidad del mensajero de *atf1* (Rodríguez-Gabriel *et al.* 2003). Por otro lado,

la radiación UV también parece activar la vía de Spc1 como consecuencia de la generación de especies reactivas de oxígeno (Degols & Russell 1997).

Para responder a estrés osmótico se requiere la actividad de las MAPKKK Win1 y Wik1 (Millar *et al.* 1995; Shieh *et al.* 1998; Shiozaki & Russell 1995b). Sin embargo no se conoce que componente detecta la señal. Por otro lado la fosfatasa Pyp2 se induce únicamente en condiciones de estrés osmótico (Millar *et al.* 1995).

En presencia de arsenito los componentes de la vía de fosforelevio no son necesarios para la respuesta (Rodriguez-Gabriel & Russell 2005; Shiozaki *et al.* 1997), ni tampoco el factor de transcripción Atf1. En cambio, Pap1 sí es necesario para responder tanto a arsenito como H_2O_2 y el factor Zip1 es específico de la respuesta a metales pero no es necesario para la respuesta H_2O_2 (Rodriguez-Gabriel & Russell 2005).

El choque térmico induce la activación de Spc1 mediante la inhibición de la fosfatasa Pyp1 (Nguyen & Shiozaki 1999; Shiozaki *et al.* 1998). Además en presencia de este estrés, no se requiere la actividad de las MAPKKK (Shiozaki *et al.* 1998).

1.6 Activación de Spc1 y sustratos de la MAPK

Frente al estrés, Spc1 es fosforilada por su MAPKK Wis1 y se transloca del citoplasma al núcleo donde interacciona con el factor de transcripción bZIP Atf1 (Fig. 3) (Nguyen *et al.* 2000; Takeda *et al.* 1995; Wilkinson *et al.* 1996) y lo fosforila. Esta interacción es análoga a la que se presenta en células de mamíferos donde p38 y JNK regulan a ATF2 (Tibbles & Woodgett 1999). Atf1 controla un amplio número de genes de respuesta a estrés dependientes de la MAPK Spc1. Sin embargo, no todos los genes dependientes de Spc1 son regulados por Atf1 (Chen *et al.* 2003), lo que indica que Atf1 no es el único sustrato de la MAPK. Posiblemente por este motivo, los mutantes *atf1Δ* presentan un fenotipo de sensibilidad a estrés menos marcado que *spc1Δ* (Egel 2004). Además, Atf1 dimeriza con el factor bZIP Pcr1 y el heterodímero se une a la mayoría de los genes regulados por Atf1. La función de Pcr1 probablemente sea la de estabilizar la unión de Atf1 a los promotores de los genes que regula (Sanso *et al.* 2008). La fosforilación por Spc1 y su unión a Pcr1, protegen a Atf1 de la degradación por el proteasoma (Lawrence *et al.* 2007).

También se ha observado que Spc1 regula la traducción mediante la modulación de la kinasa Gcn2 aunque no se conoce cuál es el efector de esta regulación (Berlango *et al.*; Dunand-Sauthier *et al.* 2005; Nemoto *et al.*). Gcn2 junto a Hri1 y Hri2, son las kinasas encargadas de fosforilar al factor de iniciación de la traducción eIF2 α , de esta manera se inhibe la síntesis de proteínas. En estrés oxidativo, la fosforilación de eIF2 α mediada por Gcn2 aumenta y reduce el

inicio de la traducción (Dunand-Sauthier *et al.* 2005) y se ha demostrado que tanto Gcn2 como Hri2 se regulan negativamente por Spc1 en estas condiciones (Berlanga *et al.* 2010).

Además de regular factores de transcripción y traducción, las MAPKs activan a otras proteínas kinasas denominadas MAPKAP. Spc1 fosforila a la proteína kinasa Srk1, homóloga a MK2 en mamíferos, que regula el ciclo celular (Lopez-Aviles *et al.* 2008). La kinasa Srk1 regula el ciclo celular mediante la fosforilación de Cdc25 en condiciones basales y en respuesta a estrés y en ambos casos depende de Spc1. Srk1 forma un complejo con Spc1, necesario para la respuesta a distintos factores como choque térmico, estrés oxidativo y osmótico (Smith *et al.* 2002). Además, Srk1 actúa reprimiendo el inicio de la meiosis y el descenso de su fosforilación en condiciones de ayuno, permite la puesta en marcha del mecanismo de conjugación (Asp & Sunnerhagen 2003). También, Spc1 interacciona y fosforila a Cmk2, una proteína kinasa relacionada, que es necesaria para la respuesta a estrés oxidativo (Sanchez-Piris *et al.* 2002; Smith *et al.* 2002).

Otra proteína con función reguladora de la ruta es Cdc37. Cdc37 es una chaperona de kinasas que forma un complejo con Spc1 y es importante para su estabilización. Cdc37 regula la transcripción génica llevada a cabo por Atf1, y en su ausencia disminuye la inducción de los genes *pyp2* y *gpd1* (Tatebe & Shiozaki 2003).

La fosforilación de la ARNbp Csx1 en respuesta a estrés oxidativo depende de Spc1 (Rodriguez-Gabriel, 2003), pero aún no se ha determinado si de forma directa o indirecta. La activación de Csx1 ocurre también por la kinasa Lkh1 (Kang *et al.* 2007).

En relación a las proteínas que interaccionan con Spc1, en Biogrid^(*) Spc1 presenta 42 interacciones físicas, con Atf1, Wis1, Cmk2, Pyp1, Pyp2, Srk1, Crm1, Hal4, Ptc4, Ptc1, Ste11, Lsk1, Tea1, Cip2, Sin1, Pap1, Tpx1, Cdc37.^(*) <http://thebiogrid.org/278148/summary/schizosaccharomyces-pombe/sty1.html>

1.7 Respuesta transcripcional al estrés

Para que las células se adapten al estrés es necesaria la producción de nuevas proteínas que harán frente al cambio ambiental. Para esto es necesario que haya una correcta regulación a nivel transcripcional. Los primeros estudios que analizaron cómo cambia la expresión génica en respuesta estrés se realizaron en *S. cerevisiae* mediante “microarrays”. En estos estudios encontraron que existe una respuesta global al estrés o ESR (*Environmental Stress Response*) (Causton *et al.* 2001; Gasch *et al.* 2000) que implica la represión o activación del 10-14% de los genes de la levadura. Entre los genes inducidos se encuentran: genes del metabolismo de carbohidratos, detoxificación de especies de oxígeno, plegado y degradación de proteínas, genes

con funciones vacuolares o mitocondriales, autofagia y transporte de metabolitos. Dentro de los genes reprimidos encontramos genes relacionados al consumo de energía y al crecimiento como el procesamiento de ARN, transcripción y traducción, biosíntesis de ribosomas y nucleótidos. Esta respuesta global al estrés o respuesta común al estrés (CER, (Causton *et al.* 2001)) es una respuesta transitoria y depende del tipo y la intensidad de estrés (Gasch *et al.* 2000).

En la levadura de fisión, los datos de análisis transcripcionales realizados por Chen y colaboradores en 2003 (Chen *et al.* 2003), han demostrado que Spc1 es necesaria tanto para la respuesta global al estrés ambiental o CESR (*Core Environmental Stress Response*), como para respuestas específicas del tipo de estrés o SESR (*Specific Environmental Stress Response*). En este estudio se observó el perfil transcripcional de una cepa silvestre o cepas delecionadas en *spc1* o *atf1* luego de aplicar diferentes tipos de estrés como: estrés osmótico (sorbitol), oxidativo (H_2O_2), metales pesados ($CdSO_4$), agentes alquilantes (MMS) y calor ($39^\circ C$). Se encontró que la respuesta transcripcional varía según la condición de estrés. Mientras que para el calor, cadmio y sorbitol es rápida y transitoria, la respuesta a H_2O_2 y MMS persiste por lo menos una hora. Además la respuesta es más débil para sorbitol y MMS que para los otros estreses. La lista completa de los genes regulados por los diferentes tipos de estrés y dependientes o no de Spc1 y Atf1 se encuentra en el sitio web www.sanger.ac.uk/PostGenomics/S_pombe/.

Al igual que en *S. cerevisiae*, en *S. pombe*, la respuesta global al estrés (CESR) presenta genes inducidos y reprimidos por estrés. Dentro de los genes inducidos se encuentran componentes propios de la señalización de respuesta a estrés como los factores de transcripción Atf1 y Pcr1, y las proteínas de señalización Mpr1, Srk1, Pka1 y Cgs1. Los perfiles de ambas levaduras se superponen; al comparar solo los genes ortólogos, de los 144 genes inducidos en *S. pombe* y 141 en *S. cerevisiae*, 49 coinciden en ambas. Y en cuanto a los genes reprimidos, coinciden 221 de los 312 genes de *S. pombe* y 432 de *S. cerevisiae* (Chen *et al.* 2003).

La respuesta específica al estrés ambiental (SESR) está representada por un subgrupo de genes que se regulan y su expresión depende del tipo de estrés. También se observa que en algunos estreses la respuesta transcripcional coincide parcialmente, lo que indica que algunos tipos de estrés generan respuestas de defensa similares.

- Unión de Atf1, Pcr1 y Spc1 a genes de estrés

Se ha demostrado que el principal factor de transcripción de la vía de Spc1, Atf1, se une a los promotores de genes inducidos por estrés en condiciones basales (Eshaghi *et al.* 2010; Lawrence *et al.* 2007). Tanto Atf1 como Pcr1 reprimen la expresión de 4-6% del total de los genes de *S. pombe* en condiciones basales y Spc1 también ejerce un rol en esta represión (Chen *et al.* 2003; Sanso *et al.* 2008). Luego, en condiciones de estrés, la unión de Atf1 a estos genes está regulada por Spc1 (Eshaghi *et al.* 2010; Lawrence *et al.* 2007).

El heterodímero Atf1-Pcr1 reconoce una secuencia CRE (cAMP response element) 5'-ATGACGT-3' (Eshaghi *et al.* 2010; Kon *et al.* 1998), y este reclutamiento está promovido por la estabilización y acumulación de Atf1 y por su modificación por Spc1. La activación de Atf1 genera la asociación de Spc1 al ADN de una manera dependiente de Atf1 y Pcr1. Sin embargo, se cree que luego Spc1 es arrastrada por la ARN polimerasa II (PolII) a las regiones codificantes (ORF) (Eshaghi *et al.* 2010; Reiter *et al.* 2008). Se desconoce si Spc1 tiene un rol en la elongación de la transcripción o si su presencia en ORFs depende de su débil unión a la cromatina no mediada por ADN (Sanzo *et al.* 2011a).

También se ha relacionado a Spc1 con el complejo SAGA, Gcn5, uno de los componentes principales del complejo regula la transcripción de genes inducidos por estrés dependientes de la MAPK Spc1. Se ha demostrado que Gcn5 se une a estos genes de una manera dependiente de Spc1 y Atf1 y regula la elongación de la transcripción (Sanzo *et al.* 2011a).

2. TRANSCRIPCIÓN EN *S. POMBE*

El proceso de transcripción depende de una amplia maquinaria en la que participan, la ARN polimerasa, factores de transcripción generales y específicos y mediadores. En los eucariotas existen tres tipos de ARN polimerasas dependientes de ADN (Pol I-III) que se encargan de la transcripción de diferentes genes. PolI sintetiza ARNr, PolII sintetiza los ARNm y algunos ARNsn U5 (*small nuclear*) y PolIII ARNt, ARNr 5S y ARNsn U6.

El estudio de la maquinaria transcripcional se ha llevado a cabo principalmente en *S. cerevisiae* y células humanas HeLa. El sistema transcripcional de *S. pombe* parece ser más cercano al de eucariotas superiores que el de *S. cerevisiae*.

En todos los organismos eucariotas, PolII está compuesta por 12 subunidades (Rpb1-12). Las subunidades 1, 2, 3 y 11 conforman el cuerpo catalítico de la enzima con actividad polimerasa. Las subunidades 5, 6, 8, 10 y 12 no son únicas de PolII y están presentes también en PolI y III (Egel 2004). Las funciones de PolII están moduladas por la fosforilación de sus subunidades. La subunidad Rpb1 presenta un dominio Carboxilo-terminal (CTD), de 29 repeticiones de la secuencia YSPTSPS. La fosforilación de CTD es necesaria para la iniciación de la transcripción. Cuando CTD es fosforilado se disocian las interacciones proteína-proteína entre CTD y factores de transcripción. Mediante experimentos de ChIP (inmunopurificación de la cromatina) se ha demostrado que CTD fosforilada en la serina 2 (Ser2) y la serina 5 (Ser5) es muy abundante en genes que codifican proteínas (Egel 2004). El estado de fosforilación de CTD

cambia a medida que PolII progresa en el ciclo de transcripción (Phatnani & Greenleaf 2006) (Fig. 4).

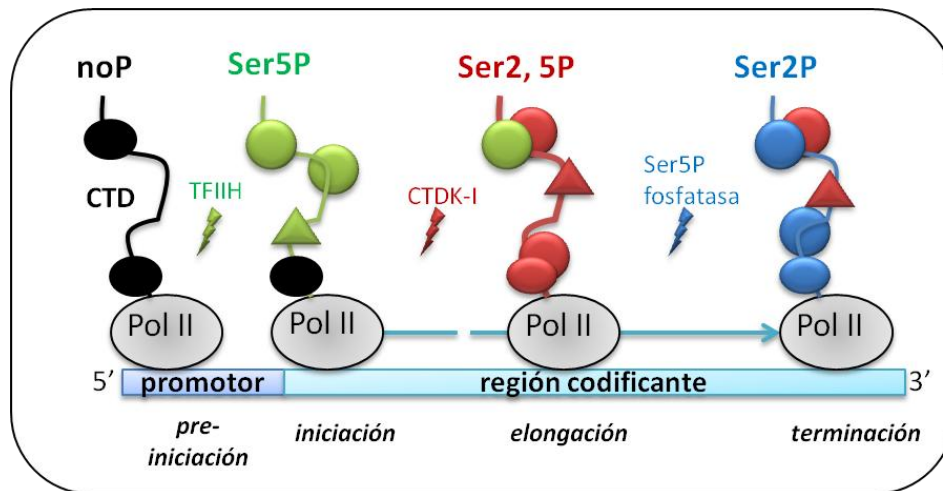


Figura 4. La fosforilación de CTD de PolII cambia en las diferentes etapas de la transcripción.

Primero ocurre la unión de PolII no fosforilada al complejo pre-iniciador en el promotor. Justo después de la iniciación de la transcripción, PolII es fosforilada en la Ser5 por la subunidad CDK7 del factor general de la transcripción TFIID y ayuda a reclutar y activar a las enzimas que agregan el cap de metilguanosina al extremo 5' del transcripto. Luego ocurre la fosforilación en Ser2 por la subunidad CDK9 del factor de elongación positivo b (P-TEFb) que activa la elongación y el procesamiento del ARN. En levaduras y algunos mamíferos, Ser5 es defosforilada en el extremos 3' del pre-ARNm, lo que está direccionado por el sitio de poli(A). La defosforilación de CTD puede ayudar a PolII a separarse del ARN y estar lista para otra ronda de transcripción (Egloff & Murphy 2008). El estado de fosforilación de CTD de PolII es por lo tanto un claro reportero de defectos en la formación del complejo de pre-iniciación o en la progresión de PolII en la elongación de la transcripción (Egloff & Murphy 2008; Sanso *et al.* 2011a).

Además de PolII, la transcripción requiere factores de transcripción, el complejo mediador y factores específicos accesorios con funciones reguladoras (Mitsuzawa & Ishihama 2004), conformando la holoenzima de PolII (Spahr *et al.* 2000). El factor general de transcripción TFIID reconoce promotores con caja TATA y un elemento corriente abajo del promotor. Además provee la plataforma para que se unan otros componentes de la maquinaria transcripcional. Está formado por la proteína TBP (TATA binding protein) y factores TAFs (TBP associated factors) (Egel 2004). Un TAF muy importante es el complejo SAGA (Spt-Ada-Gcn5 acetiltransferasa) (para revisión de SAGA en *S. pombe* y otros organismos:

(Helmlinger 2012; Helmlinger *et al.* 2011; Koutelou *et al.* 2010; Woychik & Hampsey 2002). SAGA es un co-activador y regula la expresión génica modificando la estructura de la cromatina. La estructura del complejo SAGA ha sido recientemente descrita en *S. pombe* (Helmlinger *et al.* 2011). Se ha propuesto que varias subunidades de SAGA como Gcn5, Ada2, Hfi1 y Spt8 son necesarias para la supervivencia de *S. pombe* en condiciones de estrés debido a que regulan la transcripción de la mayoría de los genes dependientes de Atf1 (Sanso *et al.* 2011b).

El complejo Mediador es un adaptador para factores reguladores, recluta y controla a PolII y su fosforilación, promueve la formación del complejo pre-iniciador y funciona luego de la iniciación (Ries & Meisterernst 2011). En *S. pombe* han sido purificados varios de sus componentes, aunque su estructura y función se ha estudiado principalmente en *S. cerevisiae* y mamíferos (Spahr *et al.* 2000). Otro regulador de la transcripción génica es el complejo Ccr4-Not que se describirá en detalle a continuación.

3. EL COMPLEJO CCR4-NOT

El complejo Ccr4-Not se concibe hoy en día como un regulador global de la expresión génica. Participa en muchas de las etapas de la regulación de la síntesis de proteínas desde la transcripción y degradación de ARNm hasta la degradación de proteínas. El complejo está conservado desde levaduras hasta mamíferos. La caracterización estructural y funcional está muy bien descrita en *S. cerevisiae*, *D. melanogaster* y mamíferos. En *S. pombe* hay estudios aislados de algunos de sus componentes.

Su regulación en respuesta a estrés se ha estudiado en *S. cerevisiae* en relación a vías de respuesta a niveles de nutrientes como glucosa y choque térmico. Pero no hay estudios de su función en la respuesta a estrés ambiental como el oxidativo, osmótico dependientes de las vías de MAPKs de respuesta a estrés como las mediadas por p38 y sus homólogos Hog1 y Spc1.

3.1 Composición del complejo

La identificación inicial del complejo se realizó en *S. cerevisiae*. Sus diferentes componentes fueron primero identificados por selección genética de proteínas que participan en la regulación de la transcripción o en otros procesos celulares. Primero se identificaron los componentes “NOT” (*negative on TATA-less*) Not1, Not2, Not3, Not4, Not5, a los que se les atribuyó la función de represión de la transcripción preferencialmente de promotores que no

tienen la secuencia TATA (Collart & Struhl 1993, 1994; Oberholzer & Collart 1998). Independientemente, se identificaron los componentes “CCR4” (*carbón catabolite repression*) Ccr4 (Denis & Malvar 1990) y Caf1 (Sakai *et al.* 1992) que son necesarios para la expresión de genes no-fermentativos reprimibles por glucosa (Draper *et al.* 1995).

En 1998, Clyde Denis y colaboradores determinaron por espectrometría de masas que las proteínas NOT eran parte de complejo formado por Ccr4 y Caf1 y confirmaron la asociación de todas estas proteínas por co-inmunopurificación y doble híbrido (Liu *et al.* 1998). Todas las proteínas co-fraccionaron luego de varias etapas de filtración en un complejo de 0.9–1.2 MDa llamado a partir de entonces “Ccr4-Not”. En 2001 se identificaron dos componentes adicionales Caf40 y Caf130 (Chen *et al.* 2001). Los componentes del complejo presentan funciones muy variadas pero todas relacionadas a la regulación de la expresión génica. Las principales funciones son: regulación de la transcripción, degradación de ARNm por deadenilación y ubiquitinación (Fig. 5).

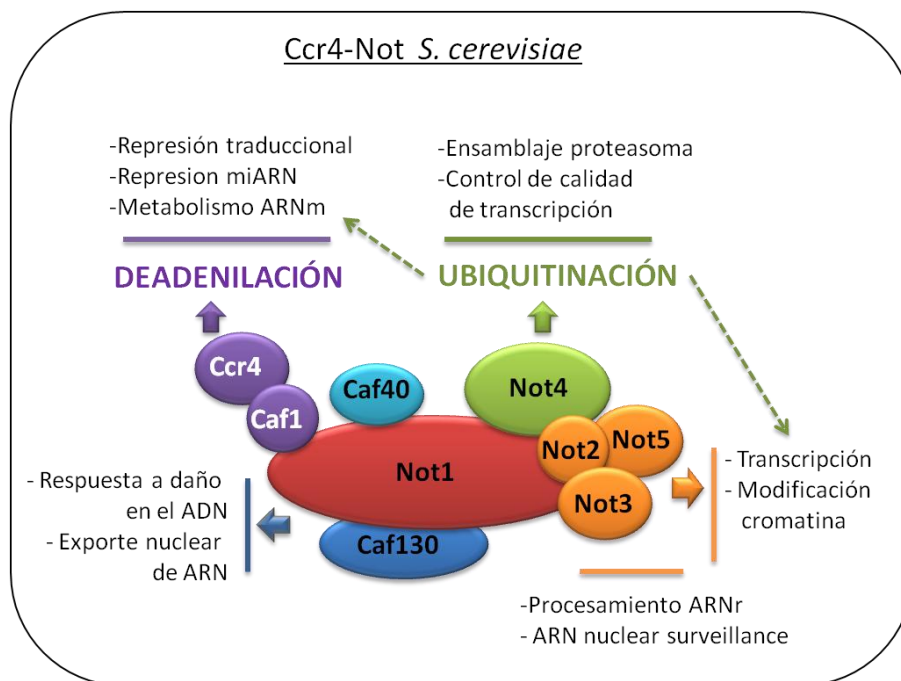


Figura 5. Composición y estructura del complejo Ccr4-Not en *S. cerevisiae* y funciones asociadas a sus componentes

3.2 Estructura del complejo

Not1 es la única proteína esencial del complejo y se cree que su función principal es ser la proteína de andamiaje del complejo. Además es una proteína de gran tamaño (2108 amino ácidos en *S. cerevisiae*) y la mayor del complejo. Los dominios N-terminal y C-terminal de

Not1 se asocian con diferentes componentes, así se puede separar el subgrupo Caf1-Ccr4 que se asocian con la porción N-terminal no esencial de Not1. La unión de Ccr4 con Not1 depende de Caf1. Por otro lado, el subgrupo de proteínas NOT interaccionan hacia la zona C-terminal de Not1 (Bai *et al.* 1999; Maillet *et al.* 2000). Por lo tanto, las proteínas NOT están separadas de Caf1 y Ccr4 no sólo funcionalmente sino físicamente. Caf130 interacciona con las porciones N-terminal y C-terminal y Caf40 con toda la proteína en ensayos de doble híbrido (Chen *et al.* 2001). Todos los componentes del complejo interaccionan con Not1 en ensayos de doble híbrido y el sitio de interacción con Not1 ha sido extensamente mapeado (Fig. 5).

Recientemente se realizó un trabajo que explora la estructura del complejo y su conformación global. Este estudio se realizó mediante la purificación de Not1 seguido de *cross-linking* en un gradiente de glicerol y microcopia electrónica (Nasertorabi *et al.*). El complejo tiene una forma de L con dos brazos de tamaño similar, aunque todavía no se ha estudiado como ésta estructura está relacionada a la función.

3.3 El complejo está conservado en todos los eucariotas

Los componentes del complejo aislados en *S. cerevisiae* están conservados en todos los eucariotas, a excepción de las proteínas Caf130 y Not5 que sólo se encuentran en *S. cerevisiae* (Fig. 6).

En eucariotas superiores existen varias isoformas para algunos componentes. Por ejemplo, en humanos, hay dos copias de Caf1: CNOT7 (hCaf1) y CNOT8 (hPOP2/CALIF), y CNOT4 humano se transcribe en tres ARNm con *splicing* alternativo y genera tres proteínas: CNOT4-N, CNOT4-S y CNOT4-L (Albert *et al.* 2000) La duplicación génica y la divergencia ha expandido los genes de *caf1* y *ccr4* en plantas, mosca, gusanos y mamíferos (Dupressoir *et al.* 2001).

<i>S. cerevisiae</i>	<i>S. pombe</i>	<i>D. melanogaster</i>	<i>H. sapiens</i>
Not1/CDC39	Not1	Not1	CNOT1
Not2/CDC36	Not2	Not2	CNOT2
Not3	Not3	Not3	CNOT3S CNOT3L
Not4/Sig1	Mot2	Not4	CNOT4 CNOT4
Not5	-	-	-
Ccr4	Ccr4	Ccr4	CNOT6 CNOT6L
Caf1	Caf1/Pop2	Caf1	CNOT7 CNOT8
Caf40	Rcd1	Caf40	CNOT9
Caf130	-	-	-

Figura 6. Proteínas homólogas de los componentes del complejo en *S. cerevisiae*, *S. pombe*, *D. melanogaster* y *H. sapiens*

Se sugiere que el complejo Ccr4-Not y su función está conservado de levaduras hasta humanos. Esto se basa en evidencias experimentales de mamíferos como que un fragmento de CNOT1, interacciona por doble híbrido con CNOT2, CNOT4 y CNOT8, y CNOT3 interacciona con CNOT8 tanto por doble híbrido como co-inmunopurificación (Co-IP). Además, CNOT4 puede complementar funcionalmente la carencia de Not4 de levaduras (Albert *et al.* 2000). En 2002, en un estudio global de aislamiento de complejos por purificación con el epítipo TAP, se identificó al complejo Ccr4-Not en humanos conteniendo CNOT1, hCCR4 (o CNOT6), CNOT8, CNOT7, y hCAF40 (o RQCD1) y hCAF130, utilizando CNOT2 epitopada con TAP (Gavin *et al.* 2002). Este complejo es muy similar en tamaño al complejo de levaduras (Morel *et al.* 2003).

Mientras que en levaduras se aíslan complejos con todas las subunidades, en humanos, se pueden aislar complejos que carecen de algunas de las subunidades. Todavía no está claro si el complejo Ccr4-Not es una entidad funcional o si está constituido también por subcomplejos pequeños que son funcionalmente activos fuera del complejo principal. Los componentes pueden funcionar tanto dentro como fuera del complejo y se han encontrado a los componentes en localización nuclear y citoplasmática (Bogdan *et al.* 1998; Collart & Struhl 1993; Shi & Nelson 2005; Tucker *et al.* 2002), compatible con las funciones citoplasmáticas y nucleares atribuidas al complejo (sección 3.4). Sin embargo, no se ha determinado si el complejo es una entidad que existe como tal en ambos compartimentos celulares. Los complejos Ccr4-Not parecen ser muy heterogéneos y esto puede explicar por qué hay poca información estructural disponible.

3.4 Funciones del complejo

La función global del complejo Ccr4-Not está dada en parte por las funciones de sus componentes. El dominio N-terminal de Ccr4-Not interacciona con las proteínas Dhh1, Caf1 y Ccr4, todas ellas relacionadas con la degradación de ARNm. Además, el mutante *not1-2* que sobreexpresa la zona amino terminal de Not1 es sintéticamente letal con las delecciones de Dhh1, Caf1 o Ccr4, lo que indica que la función de estas proteínas depende de la formación del complejo. Por otro lado el dominio C-terminal de Ccr4-Not interacciona con TFIID y con las proteínas NOT. Y las delecciones en *not2*, *not4* and *not5* son sintéticamente letales con varios mutantes de factores TAF (Deluen *et al.* 2002; Lemaire & Collart 2000). Por lo tanto estos componentes parecen estar vinculados a la regulación de la transcripción.

a) Regulación de la transcripción

Si se deleciona alguno de los componentes del complejo, más de la mitad de los ARNm del genoma presenta alterado sus niveles. Esta es una de las razones por la que se ha relacionado al complejo con la regulación de la transcripción aunque no haya una actividad enzimática concreta que conecte a los componentes con este proceso (Collart & Timmers 2004).

Hay varias evidencias experimentales que apoyan el rol de los componentes del complejo en la regulación de la transcripción. En primer lugar, las subunidades NOT se describieron como represores de la transcripción (Collart & Struhl 1994; Oberholzer & Collart 1998). Los componentes Not1, Not3, Not5 y Caf1 se aislaron como supresores de mutaciones que confieren sensibilidad a temperatura en la subunidad del mediador Med17/Srb4 (Godon *et al.* 1998). Además, la delección de las subunidades del complejo SAGA, un co-regulador de la transcripción, resulta en la supresión de la delección *not1-2* (Collart 1996) y también, mutaciones de componentes del complejo Ccr4-Not resultan en la supresión de mutaciones en Srb4 o Rpb2, componentes de la holoenzima PolII (Lee *et al.* 1998). También, la ubiquitin ligasa Not4 del complejo afecta la estabilidad de la demetilasa Jhd2, y se modifica el estado de metilación de las histonas en los promotores afectando la transcripción (Suganuma & Workman 2011). Por último, se ha descrito un rol del complejo en la regulación de la subunidad regulatoria del proteasoma, lo que afecta la transcripción dado que esta partícula es reclutada a promotores para activar la transcripción (Lee *et al.* 2005). Todos estos estudios sugieren un rol global del complejo en la transcripción.

- Iniciación de la transcripción

Varios trabajos sugieren un rol del complejo en la iniciación de la transcripción. Por ejemplo, los genes *NOT* fueron descubiertos por selección de mutaciones que aumentan la

transcripción y por aumentar la transcripción de promotores sin caja TATA del gen *HIS3* (Collart & Struhl 1994; Oberholzer & Collart 1998). Además, el complejo interacciona con TFIID y presenta varias interacciones sintéticas entre los componentes del complejo y TAF13 o TAF1 (Deluen *et al.* 2002; Maillet & Collart 2002). Not5 se asocia con promotores y es importante para la regulación de la asociación de TAF1 con los promotores y aumenta luego de estrés (Deluen *et al.* 2002). Not1 está asociado con todos los TAFs lo que sugiere que interacciona con TFIID. Not3 es la única subunidad que interacciona con TFIID por espectrometría de masas (Sanders *et al.* 2002). Tanto Caf1 y Ccr4 como las proteínas NOT son necesarias para la distribución de TBP y TAF1 en los promotores (Collart & Timmers 2004). Además, Caf1 y Ccr4 podrían afectar las interacciones de Not5 con TAFs, dado que aunque estas proteínas interaccionan en dominios opuestos de Not1, los extremos de Not1 interaccionan entre sí (Collart & Timmers 2004).

Otra evidencia del rol del complejo en la iniciación de la transcripción es su interacción con SAGA. El complejo SAGA contiene varias subunidades TAF en común con TFIID, y además otras subunidades como Spt, Ada, Gcn5 y una enzima de deubiquitinación Ubp8 en levaduras. Las conexiones con el complejo Ccr4-Not son varias, por ejemplo Not2 interacciona con Ada2 y las subunidades Ccr4, Not4 y Not5 son importantes para mantener el estado de acetilación global de histonas (Peng *et al.* 2008). Además, la subunidad de SAGA Spt3 media los fenotipos transcripcionales asociados con una mutación en Not1, aunque esta conexión ocurre en una cepa sin Spt7 que es necesaria para la integridad del complejo SAGA (Collart 1996; James *et al.* 2007).

- *Elongación de la transcripción*

Se han encontrado varias interacciones genéticas de mutantes en los componentes del complejo y factores que participan en el proceso de elongación de la transcripción. Además, varios mutantes del complejo son sensibles a 6-azauracilo (6-AU) (Denis *et al.* 2001). La sensibilidad a la droga 6-AU es una característica compartida entre los mutantes de factores que participan en la elongación de la transcripción.

Además, la conexión del complejo con la elongación de la transcripción también ha sido sugerida por las interacciones genéticas que presenta el complejo con Nhp6, una proteína relacionada en el reclutamiento del complejo FACT y otros complejos remodeladores de la cromatina (Biswas *et al.* 2006).

Un estudio reciente sugiere que el complejo promueve directamente la elongación de la transcripción (Kruk *et al.* 2011). En este estudio se concluye que las subunidades del complejo son reclutadas a ORFs tras la inducción de la transcripción y estimulan la elongación *in vivo*. Además, varias subunidades coinmunoprecipitan con PolII, y esta interacción es independiente

del dominio Carboxilo-terminal (CTD) de la subunidad Rpb1 que une la transcripción a eventos que ocurren corriente abajo. Por lo tanto, el complejo serviría como un andamiaje para reclutar los factores que contribuyen a la maduración del ARNm como por ejemplo el factor de poliadenilación. Esta interacción requiere del subcomplejo Rpb4/7 que también contribuye a unir la iniciación de la transcripción con la maquinaria post-transcripcional. En este estudio además se demuestra que los componentes de Ccr4-Not pueden unir complejos de elongación de PolIII *in vitro* y pueden estimular la reactivación del arresto de PolIII por un mecanismo diferente al de TFIIS y dependiente de la longitud del transcripto nascente (Kruk *et al.* 2011).

b) *Exporte de ARNm y vigilancia nuclear*

El complejo es uno de los principales factores que regulan la expresión de ARNm. Además de afectar la síntesis, y degradación de ARNm, se ha visto que también participa en el transporte de ARNm. Hay varias evidencias que lo demuestran, las interacciones físicas y genéticas con componentes de las partículas ribonucleares como Nab2 y Hrp, e interacciones con las subunidades de la maquinaria de transporte nuclear (Kerr *et al.* 2011) e incluso se ha observado una conexión entre el complejo y la degradación de ARNs en el núcleo (Azzouz *et al.* 2009). Además, en los mutantes del complejo se acumulan ARNs no procesados y ARNs poliadenilados. Estos ARNs generalmente son procesados y/o degradados por la maquinaria de vigilancia nuclear (*nuclear surveillance machinery*), compuesta por el exosoma y su co-factor nuclear TRAMP. El complejo interactúa con el exosoma y las subunidades TRAMP (Azzouz *et al.* 2009) y se cree que la interacción entre el complejo Ccr4-Not y el exosoma nuclear puede ser necesaria para la función adecuada del exosoma.

c) *Degradación de ARNm*

En levaduras, la principal vía de degradación de ARNm se inicia con el acortamiento de la cola de poli(A) seguida de *decapping* y luego la digestión 5'-3' del cuerpo del ARNm. La degradación de mensajeros contribuye a determinar los niveles de ARNm en la célula (Khodursky & Bernstein 2003). El acortamiento de la cola de poli(A) reduce la unión de la proteína de unión a poli(A), Pab1, primero disminuye la traducción y luego altera la estructura del RNPm (*messenger ribonucleoprotein*) en el casquete (CAP), conduciendo a *decapping* por las proteínas Dcp1/Dcp2 y la degradación 5'-3' por la exonucleasa Xrn1 (Parker 2012). En el proceso, los ARNm son secuestrados en los llamados *P-bodies*. Una vía alternativa de degradación del ARNm puede ocurrir por degradación 3'-5' por el exosoma (Rougemaille & Libri 2010). En todos los casos la deadenilación es el paso limitante de la degradación de ARNm (Fig. 7).

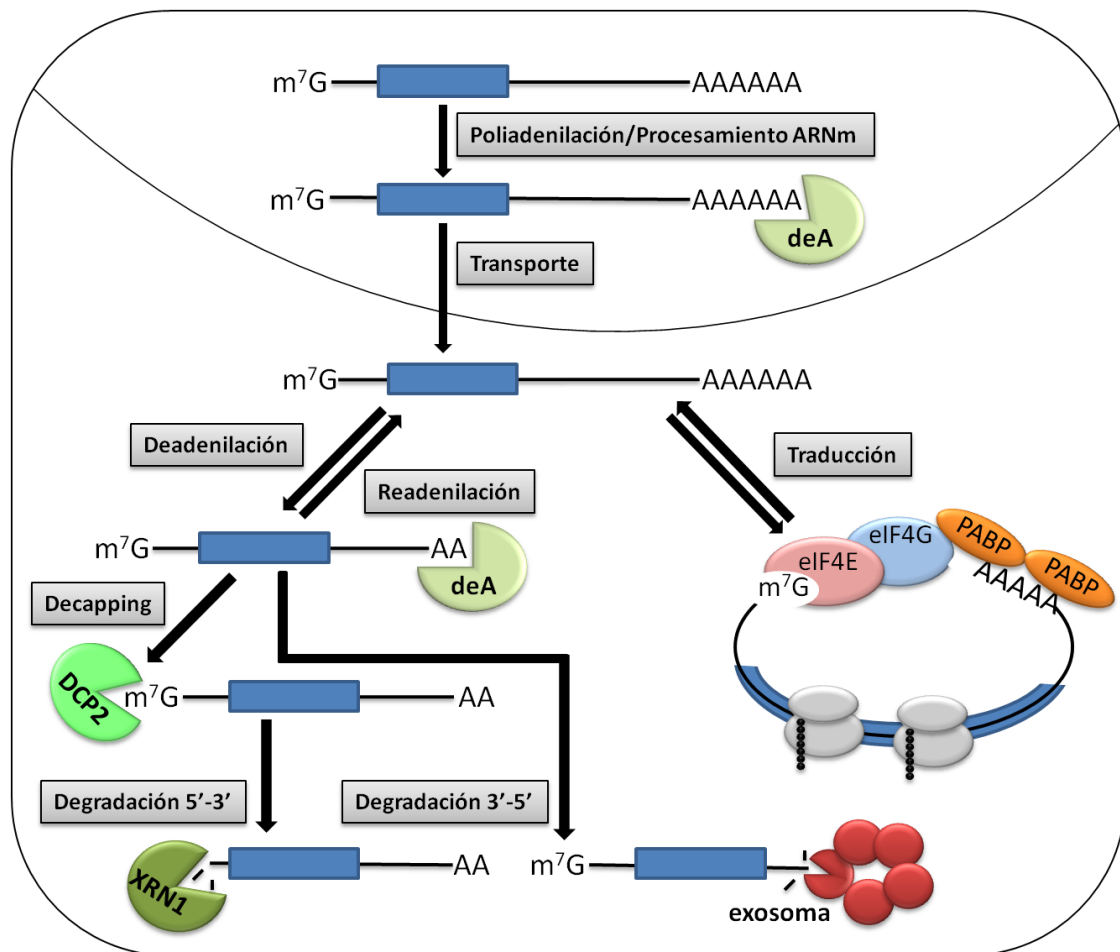


Figura 7. Ciclo del ARNm.

Los componentes del complejo Ccr4-Not, Ccr4 y Caf1, son las principales deadenilasas *in vivo* y controlan la estabilidad de una gran cantidad de ARNm (Tucker *et al.* 2002). El rol del complejo Ccr4-Not en la deadenilación ha sido revisado en varios trabajos (Bartlam & Yamamoto 2010; Wiederhold & Passmore 2010; Zhang *et al.* 2010). La actividad enzimática de Ccr4 es la de exoribonucleasa 3'-5', con una preferencia marcada por sustratos poli(A) *in vitro*. Ccr4 purificada de una cepa delecionada en Caf1 es activa *in vitro* (Viswanathan *et al.* 2003). Sin embargo, una cepa sin Ccr4 o Caf1 sigue teniendo actividad deadenilasa *in vivo*, posiblemente llevada a cabo por las nucleasas Pan2/Pan3.

En *S. cerevisiae*, parece que Ccr4 es la subunidad catalítica y Caf1 no es necesaria para la catálisis (Chen *et al.* 2002; Tucker *et al.* 2002) sin embargo es esencial para la deadenilación (Goldstrohm *et al.* 2007; Viswanathan *et al.* 2004). En *D. melanogaster* la ausencia de CAF1 conduce a mayor reducción en deadenilación que la ausencia de CCR4 (Temme *et al.* 2004) y la sobreexpresión de CAF1 catalíticamente inactiva tiene un efecto dominante negativo en la

degradación de mensajeros (Jeske *et al.* 2006). En *Aspergillus nidulans*, al igual que en humanos y tripanosomas (Schwede *et al.* 2008), también es más importante la actividad nucleasa de Caf1 que de Ccr4 en la degradación de ARNm (Morozov *et al.* 2010), mientras que en *S. pombe* no se sabe de momento. Por lo tanto, la función deadenilasa esta conservada en levaduras, ratones, mosca y humanos. Un aspecto importante es que la integridad estructural del complejo Ccr4-Not es importante para la actividad deadenilasa completa (Ito *et al.* 2011; Temme *et al.* 2004).

Las evidencias que sustentan el rol del complejo en la degradación de mensajeros son varias, en primer lugar su interacción con el exosoma (Rougemaille & Libri 2010). En segundo lugar tanto Caf1 como Ccr4 interaccionan con Dhh1, un componente de complejo de *decapping* y también con Mpt5p/Puf5p, un miembro de la familia Puf que regula la deadenilación de ARNm y su sobreexpresión puede suprimir parcialmente los fenotipos de Caf1 (Tucker *et al.* 2001). Por último, la deadenilación está impulsada por la unión de proteínas y por la unión de microARNs (miARNs) que se unen en el 3'UTR (Filipowicz *et al.* 2008). Los miARNs se asocian con proteínas Argonauta (AGO) para formar complejos de silenciamiento inducidos por ARN que reprimen la traducción y fomentan la degradación de ARNs diana. Se ha propuesto un rol en este proceso al complejo Ccr4-Not, que sería reclutado por la proteína de unión a poli(A) PABPC1 para la deadenilación de ARNs específicos (Zekri *et al.* 2009). Otros trabajos también relacionan al complejo con la represión por ARNmi, demostrando la degradación de mensajeros conducida por ARNmi es inhibida en células sin Caf1 o Not1 (Behm-Ansmant *et al.* 2006). En *D. melanogaster* el 60% de las dianas de AGO requieren Not1 o Caf1 para su expresión apropiada y el 45% requieren ambas (Eulalio *et al.* 2009). Se ha propuesto que las proteínas Argonauta interaccionan con Caf1 y Ccr4 (Collart & Panasenko 2012; Fabian *et al.* 2009).

d) *Función en las modificaciones post-traduccionales*

Esta función se basa en que en todos los mutantes de los componentes del complejo se alteran las modificaciones post-traduccionales de Msn2 y ello regula la activación transcripcional de Msn2 (Lenssen *et al.* 2002). Este fenotipo es compartido por todos los mutantes del complejo, incluido Dhh1 y es el que confiere resistencia a calor. Además la fosfatasa Glc7 interacciona con Not1 y es la que media la modificación de Msn2 y el aumento de su actividad en los mutantes Ccr4-Not (Collart & Panasenko 2012).

e) *Degradación de proteínas: Ubiquitinación*

Una forma de degradar proteínas es mediante la modificación post-traduccional de ubiquitinación. La ubiquitinación es la unión covalente de ubiquitina, una proteína de 8.5 kDa muy conservada en todos los eucariotas, a residuos de lisina. La poliubiquitinación, es el

resultado de la unión de múltiples ubiquitinas a residuos de lisina 48 y dirige a las proteínas a su degradación en el proteasoma (Hershko & Ciechanover 1998). La modificación de otros residuos de lisina o alternativamente la monoubiquitinación, está relacionada a vías reguladoras.

La transferencia de motivos ubiquitina, conlleva varios pasos enzimáticos. La activación requiere de la hidrólisis de ATP y la conjugación de la ubiquitina por la enzima E1. Luego, la ubiquitina es transferida a una enzima conjugante de ubiquitina E2. Las células de levaduras y las humanas tienen respectivamente 13 y más de 20 enzimas E2 diferentes. La modificación de la proteína sustrato conlleva una proteína ubiquitin ligasa E3 (Fig. 8).

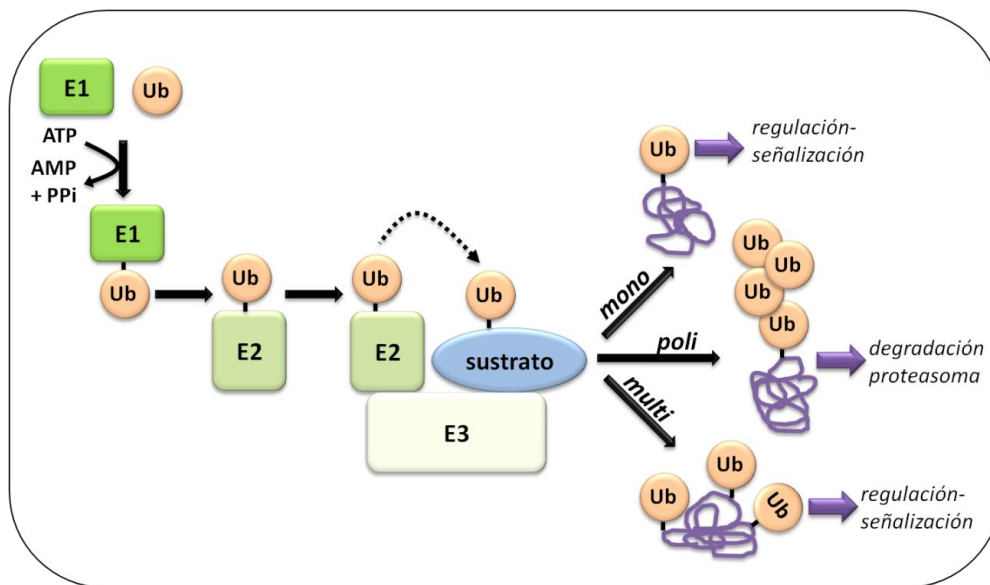


Figura 8. Proceso de ubiquitinación de proteínas.

Las ligasas E3 son críticas para el reconocimiento de sustrato y junto a la enzima E2 confieren selectividad al sistema de ubiquitina. Las ligasas E3 pueden ser divididas en enzimas E3 monoméricas como c-Cbl o enzimas E3 de multisubunidades como los complejos SCF y APC (Peters 1998). Las enzimas E3 requieren un motivo RING o HECT para la interacción con las enzimas E2.

El complejo Ccr4-Not participa en la degradación de proteínas a través del componente Not4 (Mot2 en *S. pombe*), que es una ubiquitin ligasa E3. Not4 interacciona con las enzimas ubiquitin ligasas E2 Ubc4 y Ubc5 que son las que llevan a cabo el papel principal en la ubiquitinación en células sometidas a estrés (Albert *et al.* 2002). Esta interacción está conservada en humanos (Seufert & Jentsch 1990). Los sustratos de Not4 descritos hasta el momento son Egd1 y Egd2 del complejo NAC que es una chaperona estable que se une a los péptidos nacientes del ribosoma (Rospert *et al.* 2002). Otro sustrato es la demetilasa de histonas

H3 en la lisina 4 (H3K4) Jhd2 (Mersman *et al.* 2009), que controla la metilación de histonas y la expresión génica. Es interesante que en el caso de los sustratos Egd1 y Egd2 estos son monoubiquitinados y esta modificación los estabiliza y favorece su interacción con el ribosoma y proteasoma, mientras que en el caso de Jhd2 este es poliubiquitinado y direccionado a degradación.

También se ha relacionado al complejo con el proteasoma, por una parte Not4 interacciona con la subunidad del proteasoma Rpt64.3 (Laribee *et al.* 2007). Además la integridad del proteasoma depende de Not4 y otros componentes del complejo Ccr4-Not (Panasenکو & Collart 2011), y en los mutantes Not4 hay acumulación de proteínas poliubiquitinadas (que son las direccionadas al proteasoma para su degradación). Por otra parte, varias subunidades del proteasoma copurifican con el complejo Ccr4-Not, incluso algunas chaperonas como Ecm29. Por estas interacciones se plantea un modelo en el que el complejo contribuye al ensamblaje del proteasoma (Panasenکو & Collart 2011).

3.5 El complejo Ccr4-Not se asocia con otras proteínas y complejos celulares

Se ha descrito que el complejo posee un tamaño de 1.2 MDa o 2 MDa lo que indica que además de la 9 subunidades descritas, otras proteínas copurifican con el complejo. Entre estas proteínas en *S. cerevisiae* se han descrito: Dbf2 (Liu *et al.* 1997), Mob1 (Komarnitsky *et al.* 1998), Ada2 perteneciente a SAGA (Benson *et al.* 1998), los componentes del complejo mediador de la Holoenzima Pol II (Srb9, Srb10 y Srb11), Caf4 y Caf16 (Liu *et al.* 2001), Dhh1 (Maillet & Collart 2002), TBP (Lee *et al.* 1998), TAF13 (Lemaire & Collart 2000) y TAF1 (Deluen *et al.* 2002).

El complejo Ccr4-Not interacciona con otros complejos de gran importancia en la regulación de la expresión génica como SAGA, Mediador, complejo TFIID (sección 2). Además, como ha sido mencionado al describir las funciones del complejo, hay evidencias que vinculan al complejo Ccr4-Not con la maquinaria nuclear de TRAMP y exosoma nuclear, con el complejo NAC, exosoma citoplasmático y proteasoma entre otros (Collart & Panasenکو 2012) (Fig. 9).

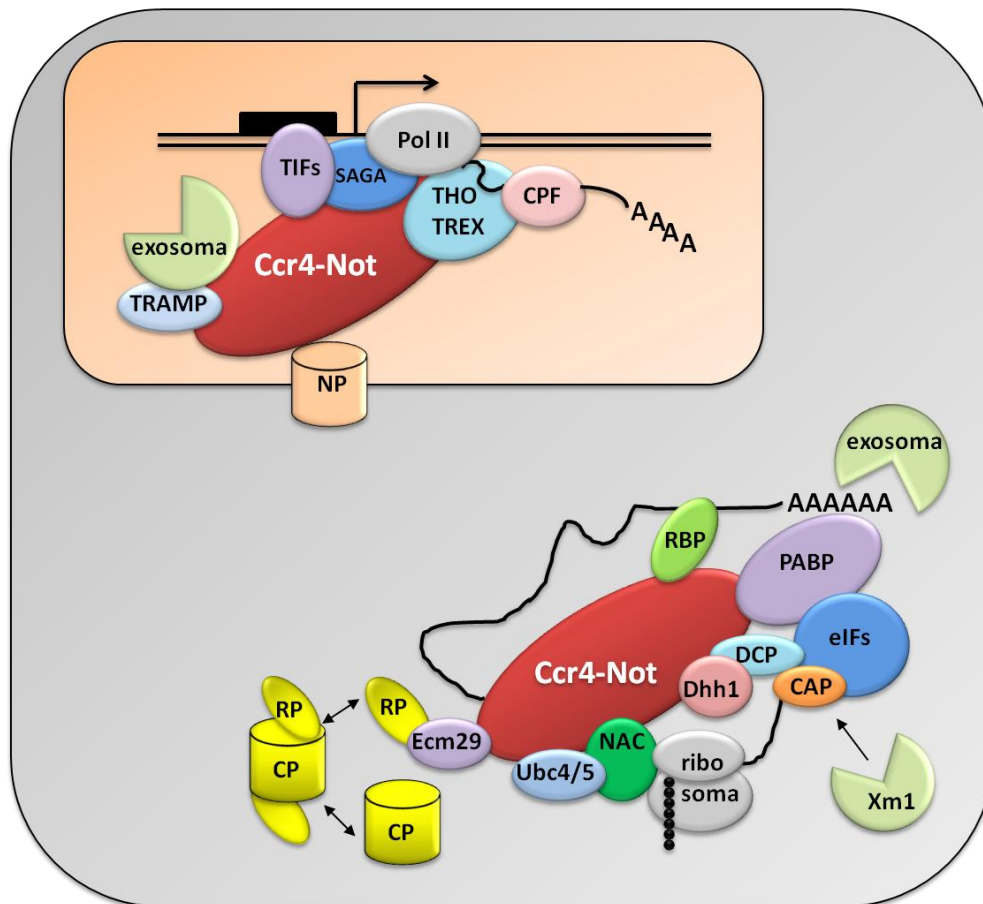


Figura 9. El complejo Ccr4-Not se asocia con otras proteínas y complejos celulares (basado en Collart 2012). Factores de iniciación de la transcripción (TIFs), ARN pol II (PolII), Factor de poliadenilación (CPF), Proteína de unión a poli(A) (PABP), Factores de iniciación de la traducción (eIFs), complejo *decapping* Dcp1/Dcp2 (DCP), helicasa Dhh1, Xrn1 exonucleasa 5'-3', proteínas de unión a ARN (RBP), poro nuclear (NP), complejo THO/TREX, cofactor del exosoma nuclear (TRAMP), enzimas conjugantes de ubiquitina E2 Ubc4/5, complejo asociado a polipéptidos nacientes (NAC), proteasoma compuesto de partícula reguladora (RP) y central (CP), chaperona del proteasoma Ecm29.

El conjunto de estudios hasta el momento sugiere que el complejo es una plataforma que regula e integra diferentes procesos celulares. Esta hipótesis ha sido integrada por Collart y colaboradores en un modelo en el que se propone al complejo como una plataforma chaperona para el ensamblaje de otros complejos celulares (Collart & Panasenko 2012).

3.6 El complejo Ccr4-Not es esencial para la viabilidad de *S. cerevisiae*

Hay suficientes evidencias que sustentan que el complejo Ccr4-Not es esencial, no porque una función en particular del complejo sea esencial, sino porque las diferentes subunidades que contribuyen a diferentes funciones celulares se ensamblan en una única

estructura. De hecho sólo Not1 es esencial para la viabilidad de la levadura, y esta subunidad probablemente actúa como proteína andamiaje del complejo.

El dominio mínimo que es suficiente para la viabilidad provee la capacidad de andamiaje (Maillet *et al.* 2000). La eliminación de subunidades individuales distintas a Not1 no es letal, y la remoción de dos subunidades que se cree contribuyen a la misma función celular (como Ccr4 y Caf1 o Not2 y Not5) no es letal. En contraste, la delección de dos subunidades que no se unen a la misma porción de Not1 o que aparentemente contribuyen a funciones celulares diferentes (como Not4 y Ccr4) es letal (Maillet *et al.* 2000). La inactivación por ARNi de todos los ortólogos de NOT analizados en *C. elegans* genera un fenotipo de muerte embrionaria temprana, y la inactivación de Caf1, pero no Ccr4, también genera este fenotipo (Maeda *et al.* 2001)

Por lo tanto el complejo puede ser visto como una plataforma esencial donde proteínas que contribuyen a diferentes funciones celulares se ensamblan. Según Collart y colaboradores uno podría imaginar que el propósito de un andamiaje así es desarrollar una función esencial de coordinación.

3.7 Papel del complejo Ccr4-Not en la respuesta a estrés en *S. cerevisiae*

La evidencia actual sugiere que una función importante de este complejo es contribuir al control de la respuesta celular a estímulos ambientales. En todos los mutantes del complejo, la activación transcripcional por Msn2, el factor de transcripción que media la respuesta a estrés ambiental en *S. cerevisiae* está aumentada (Lenssen *et al.* 2002). Además, tanto la represión como la activación de genes que ocurre tras el ayuno de glucosa requieren diferentes subunidades del complejo. De hecho, Caf1 y Ccr4 son necesarias para la expresión génica no-fermentativa (Denis & Malvar 1990; Sakai *et al.* 1992), y mutaciones en *not1* conducen a la represión ineficiente de genes en el *shift* diáuxico (Lemaire & Collart 2000). Además, la ligasa E3 Not4 interacciona con las ligasas E2 Ubc4p y Ubc5p (Albert *et al.* 2002), las cuales son importantes para la respuesta a estrés en *S. cerevisiae* (Seufert & Jentsch 1990). Finalmente, la estabilidad de ARNm de choque térmico está aumentada en células que carecen de Ccr4.

Los eventos de fosforilación son claves para algunas de estas transmisiones de señales. Not1, Not3, Not5, y Caf1 son fosfoproteínas (Ficarro *et al.* 2003; Lenssen *et al.* 2002; Moriya *et al.* 2001), y el estado de fosforilación de estas proteínas cambia, por ejemplo, si se quita glucosa del medio de cultivo. Caf1 se fosforila por la proteína kinasa Yak1, que es responsable de la fosforilación en Thr97. Cuando este aminoácido está mutado a un residuo no fosforilable, las células no responden al arresto en G1 en respuesta a limitación de glucosa, previo a la

adaptación y crecimiento bajo condiciones no fermentativas. Para Not3 y Not5, no se han identificado las kinasas (Lenssen *et al.* 2002). Tanto la eliminación de glucosa como el choque térmico conducen a la acumulación nuclear de Not2 y Not5 (Collart & Timmers 2004), y el choque térmico aumenta la asociación de Not5 con promotores de ADN (Deluen *et al.* 2002).

Los defectos que presentan las deleciones de los componentes del complejo Ccr4–Not se han asociado también con otros tipos de estrés. Por ejemplo, se ha observado el aumento en la sensibilidad a Li^+ o Mg^{2+} con mutaciones en las proteínas del complejo (Liu *et al.* 1998) y la deleción en *ccr4* y *caf1* genera sensibilidad a radiación UV (Schild 1995). Debido a que existen muchos efectos pleiotrópicos de Ccr4 en los procesos de regulación de ARNm, es difícil asegurar que estos efectos sean directos o indirectos. Sin embargo, es esperable que los componentes del complejo jueguen mas roles que los actualmente conocidos en el control de las vías celulares (Denis & Chen 2003). También varios estudios genómicos han revelado un rol para el complejo en la respuesta a daño de ADN (Mulder *et al.* 2005; Takahashi *et al.* 2007; Traven *et al.* 2005).

3.8 Complejo Ccr4-Not en *S.pombe*

Poco se conoce del complejo Ccr4-Not en *S. pombe*. En Pubmed se encuentran un total de 149 artículos sobre investigaciones que incluyen al complejo (agosto 2013), de las cuales 67 corresponden a estudios en eucariotas superiores principalmente mamíferos, 75 en *S. cerevisiae* y apenas 7 artículos en *S. pombe*.

La bibliografía disponible sobre *S. pombe* incluye un estudio del componente Caf1 y su relación con el estrés replicativo (Takahashi *et al.* 2007), la cristalografía de Caf1 (Jonstrup *et al.* 2007), y cómo afecta su afinidad y actividad enzimática el Zn^{2+} y Mn^{2+} (Andersen *et al.* 2009). Además, los componentes Caf1 y Ccr4 fueron aislados en un *screening* de sensibilidad a cafeína (Calvo *et al.* 2009) y Caf1, Ccr4, Not2 y Rcd1 fueron identificados en un *screening* de genes que participan en la estabilidad genómica mediante ensayos de sensibilidad a HU, MMS, UV entre otros (Deshpande *et al.* 2009).

En otro estudio de las tasas de síntesis y degradación de ARNm en *S. cerevisiae* y *S. pombe* los autores encontraron que la deleción de *caf1* y *ccr4* disminuye la tasa de degradación de mensajeros, pero también la de síntesis (Sun *et al.* 2012) y por último se ha publicado la implicación del complejo Ccr4-Not en la viabilidad de levaduras aneuploides (Tange *et al.* 2012). En PomBase <http://www.pombase.org/>, entre los componentes del complejo ortólogos en *S. pombe* con GO-Term *Ccr4-Not complex* se encuentran: Not1, Not2, Not3, Mot2, Caf1, Ccr4, Caf4 y Caf16, aunque Caf4 y Caf16 experimentalmente no han sido descriptos como tales.

OBJETIVOS

En un estudio previo del laboratorio, buscando proteínas candidatas a conferir especificidad a la vía de estrés mediada por Spc1, se describió una nueva proteína: Csx1 (Rodriguez-Gabriel *et al.* 2003). Csx1 es una proteína de unión ARN, participa en la estabilización de ARNm y es necesaria para responder a estrés oxidativo específicamente. Así, los mutantes en Csx1 presentan sensibilidad a agentes oxidantes pero no a otros tipos de estrés. El perfil transcripcional del mutante coincide parcialmente con los de Spc1 y Atf1. Además Csx1 es una fosfoproteína, y su fosforilación depende de estrés y de la MAPK Spc1.

La relación funcional entre Spc1 y Csx1 es uno de los interrogantes abiertos. Aunque se ha descrito una kinasa responsable de la fosforilación de Csx1, no es claro la unión de esta kinasa con la vía de estrés (Kang *et al.* 2007). Recientemente, se describió que Csx1 también participa en la diferenciación sexual, al igual que Spc1, lo que es interesante porque los fenotipos de ambas proteínas son coincidentes, lo que implica que actúan en vías similares (Matia-Gonzalez *et al.* 2012).

En la búsqueda de proteínas candidatas que interaccionen con Spc1 y Csx1 para estudiar cómo estas dos proteínas actúan de manera coordinada, se identificó a Not1, perteneciente al complejo Ccr4-Not.

El complejo Ccr4-Not, como ha sido descrito en la Introducción, es un regulador global de la expresión génica, brindando una plataforma para que se asocien diferentes complejos y proteínas celulares y por lo tanto es un buen candidato a mediar la respuesta a estímulos ambientales y conferir especificidad a la vía de respuesta a estrés mediada por Spc1.

Por estos motivos, nos planteamos el objetivo general de estudiar el papel de complejo Ccr4-Not en la respuesta a estrés mediada por Spc1. Para cumplir con este objetivo general, se plantearon los siguientes objetivos particulares:

- Estudiar la interacción de Spc1 con el complejo Ccr4-Not
- Estudiar el rol del complejo en la respuesta a estrés mediada por Spc1
- Analizar la relevancia funcional de la interacción de Spc1 con el complejo Ccr4-Not

MATERIALES Y MÉTODOS

1. MATERIAL BIOLÓGICO

1.1 Cepas de *S. pombe*Tabla 1. Listado de cepas de *S. pombe* utilizadas

Nombre	Genotipo	Experimentos	Fuente
PR109	<i>h⁻ ura4-D18 leu1-32</i>	Viabilidad; RT-PCR	Lab Paul Russell
JB22	<i>h⁻ 972</i>	Viabilidad; RT-PCR; NB; WB; ChIP	Lab Jurg Bähler
MR1000	<i>h⁻ spc1::kan</i>	Viabilidad; RT-PCR	Este trabajo
MR744	<i>h⁻ spc1::kan ura4-D18 leu1-32</i>	Viabilidad; RT-PCR	Este trabajo
FG2219	<i>h⁻ spc1::ura4 ura4-D18 leu1-32</i>	Viabilidad; RT-PCR	Lab Paul Russell
MR532	<i>h⁺ not2::kan leu1-32 ura4-D18 ade6-</i>	Viabilidad; RT-PCR	Bioneer
MR543	<i>h⁺ not3/5::kan leu1-32 ura4-D18 ade6-</i>	Viabilidad; RT-PCR	Bioneer
MR767	<i>h⁻ mot2::kan leu1-32 ura4-D18</i>	Viabilidad; RT-PCR	Este trabajo
MS90	<i>h⁻ caf1::kan</i>	Viabilidad; RT-PCR; NB	Lab Elena Hidalgo
MR542	<i>h⁺ ccr4::kan leu1-32 ura4-D18 ade6-</i>	Viabilidad; RT-PCR	Bioneer
MR952	<i>h⁻ ccr4::kan</i>	Viabilidad; RT-PCR	Este trabajo
MR531	<i>h⁺ caf4/mdv1::kan leu1-32 ura4-D18 ade6-</i>	Viabilidad; RT-PCR	Bioneer
MR530	<i>h⁺ caf16::kan leu1-32 ura4-D18 ade6-</i>	Viabilidad; RT-PCR	Bioneer
MR558	<i>h⁺ rcd1::kan leu1-32 ura4-D18 ade6-</i>	Viabilidad; RT-PCR	Bioneer
MR559	<i>h⁺ btf3::kan leu1-32 ura4-D18 ade6-</i>	Viabilidad; RT-PCR	Bioneer
MR544	<i>h⁺ ada2::kan leu1-32 ura4-D18 ade6-</i>	Viabilidad; RT-PCR	Bioneer
MR529	<i>h⁺ srb9::kan leu1-32 ura4-D18 ade6-</i>	Viabilidad; RT-PCR	Bioneer
MR528	<i>h⁺ srb10::kan leu1-32 ura4-D18 ade6-</i>	Viabilidad; RT-PCR	Bioneer
MR533	<i>h⁺ srb11::kan leu1-32 ura4-D18 ade6-</i>	Viabilidad; RT-PCR	Bioneer
MR547	<i>h⁺ pmc2::kan leu1-32 ura4-D18 ade6-</i>	Viabilidad; RT-PCR	Bioneer
MR446	<i>h⁻ not1:HA:kan</i>	Co-IP; ChIP	Este trabajo
PR1376	<i>h⁻ spc1:HA6His:ura4 ura4-D18 leu1-32</i>	Co-IP; fosforilación Spc1	Lab Paul Russell
MR95	<i>h⁺ srk1:HA:kan</i>	Co-IP	Este laboratorio
MR483	<i>h⁻ spc1:TAP:kan not1:HA:kan</i>	Co-IP	Este trabajo
MR545	<i>h⁻ not1:HA:kan spc1:Myc:ura4</i>	Co-IP	Este trabajo
MR482	<i>h⁺ not1:HA:kan csx1:TAP:kan</i>	Co-IP	Este trabajo
MR451	<i>h⁻ not1:TAP:kan spc1:HA6His:ura4</i>	Co-IP	Este trabajo
MR477	<i>h⁻ srk1:HA:kan spc1:TAP:kan</i>	Co-IP	Este trabajo
MR536	<i>h⁻ spc1:TAP:kan not1:HA:kan not2::kan</i>	Co-IP	Este trabajo
MR560	<i>h⁻ spc1:TAP:kan not1:HA:kan not3/5::kan</i>	Co-IP	Este trabajo
MR790	<i>h⁺ spc1:TAP:kan not1:HA:kan mot2::kan</i>	Co-IP	Este trabajo
MR791	<i>h⁺ spc1:TAP:kan not1:HA:kan caf1::kan</i>	Co-IP	Este trabajo
MR552	<i>h⁻ spc1:TAP:kan not1:HA:kan ccr4::kan</i>	Co-IP	Este trabajo
MR538	<i>h⁻ spc1:TAP:kan not1:HA:kan caf4::kan</i>	Co-IP	Este trabajo
MR540	<i>h⁻ spc1:TAP:kan not1:HA:kan caf16::kan</i>	Co-IP	Este trabajo
MR561	<i>h⁻ spc1:TAP:kan not1:HA:kan red1::kan</i>	Co-IP	Este trabajo
MR629	<i>h⁻ not1:HA:kan spc1:TAP:kan btf3::kan</i>	Co-IP	Este trabajo
MR562	<i>h⁻ spc1:TAP:kan not1:HA:kan ada2::kan</i>	Co-IP	Este trabajo
MR548	<i>h⁻ spc1:TAP:kan not1:HA:kan srb9::kan</i>	Co-IP	Este trabajo
MR557	<i>h⁺ spc1:TAP:kan not1:HA:kan srb10::kan</i>	Co-IP	Este trabajo
MR550	<i>h⁻ spc1:TAP:kan not1:HA:kan srb11::kan</i>	Co-IP	Este trabajo
MR563	<i>h⁻ spc1:TAP:kan not1:HA:kan pmc2::kan</i>	Co-IP	Este trabajo
MR736	<i>h⁻ spc1:TAP:kan not1:HA:kan csx1::kan</i>	Co-IP	Este trabajo
MP22	<i>h⁻ ccr4:HA:kan</i>	Co-IP- ChIP- Ensayo kinasa	Este trabajo
MS101	<i>h⁻ caf1:HA:nat</i>	Co-IP - ChIP- Ensayo kinasa	Lab Elena Hidalgo
MP7	<i>h⁻ spc1::kan caf1:HA:nat</i>	Ensayo kinasa	Este trabajo
MR923	<i>h⁻ spc1:TAP:kan caf1:HA:nat</i>	Co-IP	Este trabajo
MR555	<i>h⁺ spc1:TAP:kan ccr4:HA:kan</i>	Co-IP	Este trabajo
MR982	<i>h⁻ not1:TAP ccr4:HA</i>	Co-IP	Este trabajo
MR998	<i>h⁻ not1:TAP caf1:HA</i>	Co-IP	Este trabajo
MR983	<i>h⁻ not1:TAP ccr4:HA spc1::kan</i>	Co-IP	Este trabajo

MR984	<i>h⁻ not1::TAP caf1::HA spc1::kan</i>	Co-IP	Este trabajo
PR2082	<i>h⁻ ura4-D18 leu1-32 spc1:12myc:ura4</i>	Co-IP	Lab Paul Russell
MR712	<i>h⁻ not2::kan spc1:HA6His:ura4 leu1-32</i>	Fosforilación Spc1	Este trabajo
MR714	<i>h⁻ not3/5::kan spc1:HA6His:ura4 leu1-32</i>	Fosforilación Spc1	Este trabajo
MR944	<i>h⁺ mot2::kan spc1:HA6His:ura4 leu1-32</i>	Fosforilación Spc1	Este trabajo
MR817	<i>h⁻ caf1::kan spc1:HA6His:ura4</i>	Fosforilación Spc1	Este trabajo
MR708	<i>h⁻ ccr4::kan spc1:HA6His:ura4 leu1-32</i>	Fosforilación Spc1	Este trabajo
MR942	<i>h⁻ btf3::kan spc1:HA6His:ura4 leu1-32</i>	Fosforilación Spc1	Este trabajo
MR710	<i>h⁻ ada2::kan spc1:HA6His:ura4 leu1-32</i>	Fosforilación Spc1	Este trabajo
MR689	<i>h⁻ srb10::kan spc1:HA6his:ura4 leu1-32</i>	Fosforilación Spc1	Este trabajo
KS1479	<i>h⁻ ura4-D18 leu1-32 atf1:HA6His:ura4</i>	Fosforilación Atf1	Lab Paul Russell
MR929	<i>h⁻ not2::kan atf1:HA6His:ura4 leu1-32</i>	Fosforilación Atf1	Este trabajo
MR932	<i>h⁻ not3/5::kan atf1:HA6His:ura4 leu1-32</i>	Fosforilación Atf1	Este trabajo
MR931	<i>h⁻ mot2::kan atf1:HA6His:ura4 leu1-32</i>	Fosforilación Atf1	Este trabajo
MR941	<i>h⁺ caf1::kan atf1:HA6His:ura4</i>	Fosforilación Atf1	Este trabajo
MR943	<i>h⁺ ccr4::kan atf1:HA6His:ura4 leu1-32</i>	Fosforilación Atf1	Este trabajo
MR940	<i>h⁻ btf3::kan atf1:HA6His:ura4 leu1-32</i>	Fosforilación Atf1	Este trabajo
MR937	<i>h⁻ ada2::kan atf1:HA6His:ura4 leu1-32</i>	Fosforilación Atf1	Este trabajo
MR934	<i>h⁻ srb10::kan atf1:HA6His:ura4 leu1-32</i>	Fosforilación Atf1	Este trabajo
MR594	<i>h⁻ rpb3:3HA:nat</i>	ChIP	Damien Hermand
MP19	<i>h⁻ rpb3:3HA:nat caf1::kan</i>	ChIP	Este trabajo
NG129	<i>h⁻ rpb1:3HA:nat</i>	ChIP	Lab Elena Hidalgo
MP24	<i>h⁺ caf1::kan rpb1:3HA:nat</i>	ChIP	Este trabajo
MS112	<i>h⁻ gcn5::kan</i>	Viabilidad; NB	Lab Elena Hidalgo
MP20	<i>h⁺ gcn5::nat caf1::kan</i>	Viabilidad; NB	Este trabajo
MR 968	<i>h⁻ spc1::ura4 caf1::nat</i>	Viabilidad	Este trabajo
MR 969	<i>h⁻ spc1::nat ccr4::kan</i>	Viabilidad	Este trabajo
MR999	<i>h⁺ ccr4::kan caf1::kan</i>	Viabilidad	Este trabajo
IV66	<i>h⁻ iki3::kan</i>	Viabilidad	Lab Elena Hidalgo
MR833	<i>h⁺ ccr4::kan iki3::kan</i>	Viabilidad	Este trabajo
MR965	<i>h⁻ iki3::kan spc1::nat</i>	Viabilidad	Este trabajo
MR976	<i>h⁻ iki3::kan caf1::nat</i>	Viabilidad	Este trabajo
MR690	<i>h⁺ mts2 spc1:Myc:ura4</i>	Ubiquitinación Spc1	Este trabajo
MR691	<i>h⁻ mts3 spc1:Myc:ura4</i>	Ubiquitinación Spc1	Este trabajo
MR754	<i>h⁻ fbh1::kan spc1:TAP not1:HA leu1-32</i>	Ubiquitinación Spc1	Este trabajo
JB50	<i>h⁹⁰ 968</i>	Mating/diferenciación	Lab Jürg Bähler
JB489	<i>h⁹⁰ ste11::ura4 ura4-D18</i>	Mating/diferenciación	Lab Jürg Bähler
MR777	<i>h⁹⁰ not2::kan</i>	Mating/diferenciación	Este trabajo
MR778	<i>h⁹⁰ not3/5::kan</i>	Mating/diferenciación	Este trabajo
MR785	<i>h⁹⁰ mot2::kan</i>	Mating/diferenciación	Este trabajo
MR786	<i>h⁹⁰ caf1::kan</i>	Mating/diferenciación	Este trabajo
MR774	<i>h⁹⁰ ccr4::kan</i>	Mating/diferenciación	Este trabajo
MR773	<i>h⁹⁰ caf4::kan</i>	Mating/diferenciación	Este trabajo
MR772	<i>h⁹⁰ caf16::kan</i>	Mating/diferenciación	Este trabajo
MR776	<i>h⁹⁰ rcd1::kan</i>	Mating/diferenciación	Este trabajo
MR775	<i>h⁹⁰ btf3::kan</i>	Mating/diferenciación	Este trabajo
MR771	<i>h⁹⁰ ada2::kan</i>	Mating/diferenciación	Este trabajo

Varias de las cepas fueron obtenidas de la biblioteca de deleciones de Bioneer. Esta biblioteca contiene 2662 mutantes de delección haploides. El número total de genes que codifican proteínas en *S. pombe* es 4941^(*), de ellos un 17.5 % de estos genes son esenciales (Decottignies *et al.* 2003). Por lo tanto la colección representa el 65% de los genes no esenciales de *S. pombe*. Dado que algunas de las cepas no se encuentran en la colección o incluso no están correctas, realizamos estas deleciones en el laboratorio (*spc1::kan* y *mot2::kan*).

(*) http://www.sanger.ac.uk/Projects/S_pombe/genome_stats.shtml.

1.2 Cepas de *E. coli***Tabla 2. Listado de cepas de *E. coli* utilizadas**

Nombre	Genotipo	Referencia
DH5 α	F' <i>deoR endA1 gyrA96 hsdR17(r_K⁻ m_K⁺) recA1 relA1 SupE44 thi-1 Δ(lacZYA-argF)U169 Φ80dlacZΔM15 λ⁻</i>	(Hanahan, 1983)
XL-1 Blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac</i> [F' <i>proAB lacI^fZΔM15 Tn10 (Tet^r)</i>]	Stratagene
JM110	<i>rpsL thr leu thi lacY galK galT ara tonA tsx dam dcm glnV44 Δ(lac-proAB) e14- [F' traD36 proAB⁺ lacI^f lacZΔM15] hsdR17(r_K⁻m_K⁺)</i>	(Sanger <i>et al.</i> 1980)
Rosetta-gami2 (DE3)	Δ (ara-leu)7697 Δ lacX74 Δ phoA PvuII <i>phoR araD139 ahpC galE galK rpsL (DE3) F'[lac⁺ lacI^f pro] gor522::Tn10 trxB pLysSRARE (Cam^R, Str^R, Tet^R)</i>	Novagene

2. PLÁSMIDOS

Tabla 3. Listado de plásmidos

Plásmido	Uso	Fuente
pFA6a-KANMX6-TAP	epitopar con TAP	(Bahler <i>et al.</i> 1998)
pFA6a-KANMX6-3HA	epitopar con HA	(Bahler <i>et al.</i> 1998)
pFA6a-KANMX6	deleción génica con kanamicina	(Bahler <i>et al.</i> 1998)
pFA6a-NATMX6	deleción génica con nourseotricina	(Hentges <i>et al.</i> 2005)
pREP1 Ub:HA	sobreexpresión de Ubiquitina	(Takeda & Yanagida 2005)
pREP1 Ub:His	sobreexpresión de Ubiquitina	(Takeda & Yanagida 2005)
pRSET-C	expresión proteínas en <i>E.coli</i> (His)	Invitrogen
pGEX	expresión proteínas en <i>E.coli</i> (GST)	GE Healthcare
pREP42-HA	plásmido vacío para sobreexpresión	(Basi <i>et al.</i> 1993)
pREP42 spc1:HA	sobreexpresión de spc1	Este trabajo
pRSET-C not1_0	Co-IP <i>in vitro</i> Not1 Spc1	Este trabajo
pRSET-C not1_635	Co-IP <i>in vitro</i> Not1 Spc1	Este trabajo
pRSET-C not1_1117	Co-IP <i>in vitro</i> Not1 Spc1	Este trabajo
pRSET-C not1_1455	Co-IP <i>in vitro</i> Not1 Spc1	Este trabajo
pGEX spc1	Co-IP <i>in vitro</i> Not1 Spc1	Este trabajo
pREP42 spc1:HA K156R	ubiquitinación Spc1	Este trabajo
pREP42 spc1:HA K38R	ubiquitinación Spc1	Este trabajo
pREP42 spc1:HA K49R	ubiquitinación Spc1	Este trabajo
pREP42 spc1:HA K38R K49R K156R	ubiquitinación Spc1	Este trabajo
pREP42 spc1:HA K143R	ubiquitinación Spc1	Este trabajo

3. OLIGONUCLEÓTIDOS

Tabla 4. Listado de oligonucleótidos utilizados

Oligonucleótido	Uso	Secuencia
275.not1_TAG_forw	Epitopar not1 con plásmido pFA	GTCTCCATGAACATGTCATGGCACCCTCCTCAGCTATAAT GTCTCTACCGAAGAGGCTACAGAACTGATGGGCAAGTTCG GATCCCCGGGTTAATTAA
276.not1_TAG_back	Epitopar not1 con plásmido pFA	TGGTAGATAACCAAATTAAGTATTAGTAAACATTTTCGGT CTTTGACCCTTTATGAAATTAACGAAATCCATTTGGCCA GAATTCGAGCTCGTTTAAAC
277.not1_TAG_check	Chequeo epítipo	CACTATAGATTTTAAATAACG
F84.ccr4_tag	Epitopar ccr4 con plásmido pFA	ATATTTGCTTGCTGGCCGAGTTTAAAGTGAAACAGGAGAA GACACCCTTACCTTCATCAAAGTTTAAACATGATAAAAAA CGGATCCCCGGGTTAATTAA
F85.ccr4_tag	Epitopar ccr4 con plásmido pFA	AATGCAGAATCATAACATCAAATCCATCTACTTGCTACTAA GTATCACTCTAAAATCTACAAACACGACAAAACTAACAA GAATTCGAGCTCGTTTAAAC
466.not4_FW	Delecionar mot2/not4 con plásmido pFA	TCTGTATTGTATAACGAGCGACCTTAAACAGTATCGATTT GGAGAGCACTGTGACGGAGATTTGACATATTTACACAAA CGGATCCCCGGGTTAATTAA
344.oligonucleótidoDel_not4_RV	Delecionar mot2/not4 con plásmido pFA	AGGAACCCATAGAGAATTTATCTTTAAATTTTTTAATAA TATTTATGTAAATACTACAAAACCTTAAATGAAAAAGAAGA GAATTCGAGCTCGTTTAAAC
449.Spc1DelForw	Delecionar Spc1 con plásmido pFA	TACTTTTCGATATAGACGAAGGACGCTTAAATTTTTGAGA TTATTGTTGAATAGTCCTTTTGTAAACAGTTTGAATAAA CGGATCCCCGGGTTAATTAA
382.spc1_TAG_RV	Delecionar Spc1 con plásmido pFA	CCGATGACCATTAGAATAATAGAAAAGCCTAAAATTCCAT GGAACCGAGATGATATAAATATGATACACGTGAACAAAAT GAATTCGAGCTCGTTTAAAC
383.spc1_TAG_check	Chequeo delección	CATTACTTGAAAGAGGAAGTTGG
F86.ccr4_check	Chequeo epítipo	GTAACCGGTTTGTTGAAAGGAG
308.srb10_delcheck	Chequeo delección	TAGACCAATTTCTGCAAAGCTAGTG
309.not3/5_delcheck	Chequeo delección	TTGAATGATGATGAACAATATGCTG
310.caf4_delcheck	Chequeo delección	CACCGTTATGTGATAAAAACCATTC
311.srb11_delcheck	Chequeo delección	TGAATTTATTATATAATTGCCGGA
312.ada2_delcheck	Chequeo delección	TTCTCATTTTTACTCATAACATGCCG
313.srb9_delcheck	Chequeo delección	ACTGTTTCTCTTGTTTCAAAAACG
314.ccr4_delcheck	Chequeo delección	CGCTCGTTGTAATTTGTTGGTTTTT
315.not2_delcheck	Chequeo delección	CTTATACCAGTTGGCACTTTTACGA
316.caf1_delcheck	Chequeo delección	ATTAATACAAAACCCGATGAAAGGC
317.caf16_delcheck	Chequeo delección	AAGCATCTGTTAAAAGCAATAATGC
329.srb10_cp5check	Chequeo delección	AGACATTATGCTGCATATCGCATGA
330.ada2_cp5check	Chequeo delección	ATTTTACAGAATCGATTTCGTTTGA
335.rcd1_delcheck	Chequeo delección	ATTAAATGCGTCGGCGAATGTTATA
336.pmc2_delcheck	Chequeo delección	GATGACATGTTTGAGAAATGGGGAG
337.btf3_delcheck	Chequeo delección	ACGCCGCATCGAAAATTTAGTTTAT
339.caf1_delcheck	Chequeo delección	CGAGTAAACAAGTTCAAGC
342.not4_delcheck	Chequeo delección	ATGTGCTATGTATGAGGTGG
452.fbh1_cp5	Chequeo delección	AACCAAGAGGTCGTTGATGAGAAAT
502.iki3check_RV	Chequeo delección	CAGAATGAAGAGCGGAAATAC
455.gpd1_FW	PCRq	AAGCTCACCGAAGTATTCACGA
456.gpd1_RV	PCRq	GCATTCGATGCCGGGTAA
457.srx1_FW	PCRq	GCAAAAAGGTTTCGCTGCAA

458.srx1_RV	PCRq	GCACCCAGATACAGGCGTAGA
459.zym1_FW	PCRq	AAGCCTTGCGACTGCCAAT
460.zym1_RV	PCRq	CAACCACAAGACTCTTTGCAATCT
469.kantest_FW	Chequeo delección o epitope kan/ nat	TGGTCGCTATACTGCTGTCG
447.spc1cloning_RV	Clonación Spc1 en pREP42	GGAATTCGGATCCTTAGGATTGCAGTTC
448.spc1cloning_FW	Clonación Spc1 en pREP42	CGAATTCATATGGCAGAATTTATTC
470.spc1K49R_FW	Mutagénesis Spc1	TGTCGCGGTCCGTAAAATTATGAAACCCTTAG
471.spc1K49R_RV	Mutagénesis Spc1	AATTTTACGGACCGCGACATTTCATTCCAGTTAGC
472.spc1K143R_FW	Mutagénesis Spc1	TCACCGGGACCTGCGTCCCAGTAACATCTTAATTAAC
473.spc1K143R_RV	Mutagénesis Spc1	ACTGGGACGCAGGTCCCGGTGAATAACACCGGCAGAATG
477.spc1K156R_FW	Mutagénesis Spc1	GATTTACGTATCTGCGATTTTCGGTTTGGC
478.spc1K156R_RV	Mutagénesis Spc1	GCAGATACGTAAATCGCAATTTTCGTTAA
479.spc1K38R_FW	Mutagénesis Spc1	TCAGCGCGTGATCAGCTAACTGGAATGAATG
480.spc1K38R_RV	Mutagénesis Spc1	CTGATCACGCGCTGAACAAACGAGGCCAAAG
481.spc1K143R_FW2	Mutagénesis Spc1	TCACCGAGATCTGCGTCCCAGTAACATCTTAATTAACG
482.spc1K143R_RV2	Mutagénesis Spc1	ACTGGGACGCAGATCTCGGTGAATAACACCGGCAGAA
483.not1cloning0_FW	Co-IP <i>in vitro</i>	AAGCGGGATCCATATGAAGAGCCAAG
484.not1cloning0_RV	Co-IP <i>in vitro</i>	TAAACAGATCTTTAACACAAAATTTGGACA
485.not1clonig635_FW	Co-IP <i>in vitro</i>	CCAAAGGATCCGTCTTCAAGTTTATCC
486.not1clonig635_RV	Co-IP <i>in vitro</i>	ACCGCAGATCTTTTATACTGTTATTTGCGAA
487.not1clong1117_FW	Co-IP <i>in vitro</i>	GCAAAGGATCCTAACGGATGCGGTA
488.not1clong1117_RV	Co-IP <i>in vitro</i>	ATCGCAGATCTTTATGTGGATGCTTGAC
489.not1clong1455_FW	Co-IP <i>in vitro</i>	TCAAGGGATCCCAAAACTGCGATAAA
490.not1clong1455_RV	Co-IP <i>in vitro</i>	GCACAAGATCTTTAAACTTGACCCATC
491.spc1clongpGEX_FW	Co-IP <i>in vitro</i>	CAGTTGGATCCAAATGGCAGAATTTATTC
492.spc1clongpGEX_RV	Co-IP <i>in vitro</i>	CTACACTCGAGTTAGGATTGCAGTTCAT
548.gpd1_prom	ChIP	TTACGTAATTTTCTCTTTGCTTC
549.gpd1_prom	ChIP	TGACGTAAAAACACTACACTTGGTC
862.gpd1_ORF	ChIP	GAGAACTCGGTATTTACTGTGGTG
863.gpd1_ORF	ChIP	AGGAGGGTTGAAACCAATAGTAGTC
864.gpd1_ter	ChIP	CTTGATGCATAGATCGAGGTTGTT
865.gpd1_ter	ChIP	GATAACAAGAGACTCACAAAGCACA
923.ctt1_prom	ChIP	ATAATGATGCTCTTTGGCTCACTAA
924.ctt1_prom	ChIP	CTGGTGTAGAATTACCAACGTCATA
925.ctt1_ORF	ChIP; PCRq	ATCGCTACAACATTTTCGATCTTAC
926.ctt1_ORF	ChIP; PCRq	AATTGGTAGGATTCTGATTCAAGGT
927.ctt1_ter	ChIP	CAAGTCTTCTGCCGTAAATTTCTTA
928.ctt1_ter	ChIP	CTCATGAATTTGCTTTTAAGCTTTC
B25.atf1_prom	ChIP	TTTAAGTATCGTCTTGCTCGGTTT
B26.atf1_prom	ChIP	CACTTTGCATGATTGAACTTAACC
B27.atf1_prom2	ChIP	TGCTGTTGAAGTACGAATCTCTTTA
B28.atf1_prom2	ChIP	GATTATATGAATGTGGAGGCCTTTT
B29.atf1_ORF	ChIP	ATTTATGATGCTACTCTTCGTCCTG
B30.atf1_ORF	ChIP	TTAACACCAGGAGTAAATCCAGTTC
B31.atf1_ter	ChIP	CGAAGGTTGAATTTTATGGTAATGA
B32.atf1_ter	ChIP	AGCAATCAATAAGGTCTTCAAACCTC
JA488_CHIPnegcontrol	ChIP	TTTGTCAAAAAGTTTTCCACATAC

JA489_CHIPnegcontrol	ChIP	GCGGTTTCCTTTCTAAGAGACT
MATL-68	Chequeo tipo sexual	AAAGAGAGTGAGAAGAAGGG
P581	Chequeo tipo sexual	AAATTGTATTGGTGTTACTAACC
M344	Chequeo tipo sexual	GTAGGTGTAGAGTGTGGAGGG

4. MEDIOS DE CULTIVO

Los medios para el crecimiento de *S. pombe* fueron adquiridos de Formedium (<http://www.formedium.com/>) y se prepararon siguiendo las instrucciones del fabricante. Los medios utilizados fueron:

- YES (*yeast extract supplements*) o medio rico: 30 g/l glucosa, 5 g/l extracto de levadura, 225 mg/l adenina, lisina, leucina, histidina y uracilo,
- EMM (Edinburgh Minimal Media) o medio mínimo: 3 g/l Ftalato potásico, 2.2 g/ Na₂HPO₄, 5 g/l NH₄Cl, 20 g/l glucosa, sales, vitaminas y minerales (Moreno *et al.*, 1991). Este medio se suplementa con 225 mg/l adenina, lisina, leucina, histidina y uracilo según sea requerido, utilizándose para selección de plásmidos. Para la represión de la expresión de los vectores pREP se agregó 5 µg/ml tiamina.
- EMM-N (Edinburgh Minimal Media without Nitrogen): EMM sin NH₄Cl.
- ME (Malt Extract): 30 g/l Bacto™ Malt Extract.

Para seleccionar inserciones génicas con *cassettes* de resistencia a kanamicina (KAN) o nourseotricina (NAT), se agregó 150 µg/ml de antibiótico G418 o 40 µg/ml de nourseotricina a las placas de YES.

El medio utilizado para cultivar *E. coli* fue LB (Luria-Bertani): bactotripton 1%, extracto de levadura 0.5%, NaCl 1%. Para seleccionar transformantes se agregó ampicilina 100 µg/ml. En el caso de transformantes de la cepa Rosetta-gami2, se agregó además cloranfenicol 35 µg/ml.

Para todos los medios sólidos se agregó 2% de agar (Bacto™ Agar (BD)).

5. CRECIMIENTO Y MANIPULACIÓN DE MICROORGANISMOS

Para su almacenamiento, las cepas de levadura se congelaron a -80°C en 30% de glicerol y las de *E. coli* en 15% de glicerol. Para su uso diario, las cepas de levadura se mantuvieron a 4°C en placas de medio rico o medio mínimo y los experimentos se realizaron

con cultivos en medio líquido cultivados a 30°C en agitación 180-200 rpm. Las cepas termosensibles se cultivaron a 25°C y luego, para inactivar la proteína de interés, a 36°C.

Los cultivos en fase exponencial a una DO_{600} de 0.5 tratados o no según el experimento, se recogieron por centrifugación a 2000 xg durante 2 min o por filtración, en el caso de los experimentos de fosforilación de Spc1 y Atf1. La filtración se realizó utilizando filtros de celulosa en un soporte de filtración (Pall), de esta manera se consigue que las células no sufran estrés por centrifugación que activa la fosforilación de Spc1 y Atf1. En el caso de los experimentos de inducción de Ste11, los cultivos crecieron en medio mínimo a 30°C, se recogieron las células por filtración, lavaron con 2 volúmenes de medio mínimo sin nitrógeno (EMM-N) o medio mínimo con metionina 200 mg/l (EMM Met) y se resuspendieron en EMM-N o EMM-Met e incubaron a 30°C.

Los cultivos de *E. coli* se incubaron a 37°C en agitación 200 rpm toda la noche para la extracción de ADN plasmídico. Para los experimentos de Co-IP *in vitro*, los cultivos se incubaron hasta fase exponencial DO_{600} :0.5 y la inducción de la expresión de los plásmidos se realizó agregando 0.3 mM de IPTG durante 4 horas a 23°C. Los cultivos se recogieron por centrifugación 10000 xg, 2 min a 4°C.

5.1 Ensayos de viabilidad por dilución en placa

Los cultivos de levadura en medio líquido se dejaron crecer hasta fase exponencial (DO_{600} 0.2-0.6) y luego se realizaron diluciones seriadas 1:5 en placas multipocillo. Después se realizó el goteo en placas con medio YES o EMM con la adición de KCl (0.4-1.2 M) a partir de una solución madre 2.4 M, H_2O_2 (0.25-2 mM), 6-azauracilo (100-300 µg/ml) preparado 50 mg/ml en NH_4OH o ácido micofenólico (100-300 µg/ml) preparado 50 mg/ml en metanol, con un replicador para 48 muestras de V&P Scientific (modelo VP407AH). Las placas se incubaron 72 horas a 30°C y a 37°C o 40°C para ensayos de alta temperatura.

5.2 Eficiencia de mating

Para calcular la eficiencia de *mating*, las cepas se inocularon en una placa de ME a 25°C durante 24 o 48 horas y se realizó el conteo de células, cigotos y tétradas utilizando una cámara de Neubauer. Se contaron como mínimo 200 células y la eficiencia de *mating* se calculó como el porcentaje de (cigotos + tétradas) $\times 2 / [(cigotos + tétradas) \times 2 + células]$.

6. TRANSFORMACIÓN CELULAR

6.1 Transformación de *E. coli*

Las células se hicieron competentes según el método de cloruro de rubidio (Sambrook & Russell 2006b) y los plásmidos portadores de genes codificantes de beta-lactamasas (resistencia a ampicilina), se transformaron mediante choque térmico (Hanahan 1983). La obtención de plásmidos a partir de *E. coli* se realizó utilizando el kit de *minipreps* de Promega.

6.2 Transformación de *S. pombe*

Para la introducción en levadura de cassettes de delección o epitopado (ver sección 7.2) las cepas de *S. pombe* se transformaron según el método del acetato de litio y choque térmico (Okazaki *et al.* 1990). Las transformaciones de plásmidos se realizaron mediante electroporación aplicando un voltaje de 2.5 kV (Sabatinos & Forsburg 2010).

7. TÉCNICAS GENÉTICAS

7.1 Obtención de cepas por cruce

Para obtener cepas dobles o triples mutantes se realizó el cruce de las cepas parentales de tipo sexual opuesto en placas de ME por 3 días a 25°C. Luego las tétradas se diseccionaron con un microscopio Singer y se incubaron a 30°C por 3-4 días. Las esporas germinadas se seleccionaron en placa y luego se comprobó su genotipo por PCR de colonia o Western Blot. En el caso de cepas delecionadas o epitopadas con los mismos marcadores, se observó al segregación genética de los mismos para obtener los dobles o triples mutantes.

Para averiguar el tipo sexual se realizó el cruce de la cepa en cuestión con una cepa h^+ y una h^- en placas de ME a 25°C y se observó la esporulación luego de 24 horas o mediante PCR específica del locus de *mating* según (Sunnerrhagen 1993). Esta estrategia se basa en utilizar oligonucleótidos que hibridan en las secuencias génicas *mat1*, *mat2-P* y *mat3-M* de manera que en una cepa h^- se amplifica un producto de 432 nucleótidos, en una cepa h^+ 671 nucleótidos y en una h^{90} ambos productos.

7.2 Delección o epitopado con cassettes de KAN o NAT

Se utilizaron los plásmidos derivados de pFA6a descritos en la tabla 3. Se diseñaron oligonucleótidos de 100 pb que presentan 20 nucleótidos de homología con el plásmido pFA6a y 80 nucleótidos que aparean con las regiones 5' y 3' del gen a deleccionar y en la región 3' del gen a epitopar (Bahler *et al.* 1998) (Tabla 4). Se realizó PCR utilizando como molde los plásmidos pFA6a y luego se transformó *S. pombe* con el producto de PCR que se inserta en el genoma por recombinación homóloga. La transformación se extiende en placas de medio rico sin selección y luego de 24-36 horas, se replican en medio selectivo con G418 o nourseotricina según corresponda por 72 horas. Las colonias estables se comprueban mediante PCR con oligonucleótidos que hibriden en el gen de resistencia a kanamicina o nourseotricina y en la región 3' UTR o 5' UTR del gen (Tabla 4)

8. TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR

8.1 PCR

Para la comprobación de clonaciones, delecciones o epitopados se utilizó la polimerasa ExTaq de Takara y se realizó PCR de colonia. Para amplificar productos génicos para realizar clonaciones o mutagénesis, se utilizó la enzima Pfu Turbo (Stratagene) utilizando como molde 100 ng de ADN genómico extraído según (Hoffman & Winston 1987).

8.2 Visualización de ácidos nucleicos

Los métodos utilizados para separar fragmentos de DNA en geles de agarosa/TAE fueron los descritos por (Sambrook & Russell 2006a). Los ácidos nucleicos se visualizaron agregando 5 µg/ml de bromuro de etidio o 0.1% SYBR Safe (Invitrogen).

8.3 Mutagénesis dirigida

La mutagénesis de las lisinas de Spc1 se realizó según del método de (Zheng *et al.* 2004). Para ello se diseñaron oligonucleótidos solapantes con la mutación puntual flanqueados por dos zonas de homología de 6 nucleótidos hacia el 5' y 20 nucleótidos hacia el 3' en orientaciones opuestas. Se realizó PCR utilizando como molde el plásmido pREP42-Spc1:HA

de manera de amplificar el plásmido completo pero incluyendo la mutación. Luego se realizó la digestión con la enzima DpnI (esta enzima digiere el ADN molde que se encuentra metilado pero no el ADN no metilado producido por PCR) y se transformó *E. coli*.

8.4 Clonación

Se realizó a partir de productos de PCR amplificados con oligonucleótidos con sitios de restricción terminales de las enzimas NdeI-BamHI para la clonación de *spc1* en pREP42, BamHI-BglII para la clonación de *not1* en pRSET-C y BamHI- XhoI para la clonación de *spc1* en pGEX. En el caso de clonar en pREP42-HA, se utilizó el vector pGEM-T (Invitrogen) para subclonar los fragmentos. Para purificar bandas de gel de agarosa se utilizó *gel extraction kit* de Qiagen y las ligaciones se realizaron con los reactivos de Fermentas.

9. ANÁLISIS DE ARN

9.1 Northern Blot

Se recogieron 30 ml de cultivos en fase exponencial tratados o no según el experimento y los pellets se congelaron a -80°C. La extracción de ARN se realizó mediante fenolización ácida. Para ello, se agregó a los pellets 0.4 ml de tampón AE (50 mM acetato sódico pH 5.3, 10 mM EDTA pH 8, SDS 1%.) y las proteínas y el ADN se extrajeron por adición de 0.3 ml de fenol ácido e incubación a 65°C por 10 min. Luego se añadió 0.3 ml de cloroformo y se separaron las fases acuosa y orgánica por centrifugación a 21000 xg 5 min. Se recuperó la fase acuosa y se realizó una nueva extracción con 0.3 ml de cloroformo y centrifugación. El ARN de la fase acuosa se precipitó con 1 ml etanol 100% y 40 µl de AcNa 3M pH 5.3 durante 1 hora a -80°C o 16 horas a -20°C. Luego se centrifugó por 15 min a 21000 xg, se realizó un lavado con etanol 70% y el pellet de ARN seco se resuspendió en 50-100 µl de H₂O DEPC y se incubó 1-4 horas a 4°C. La cantidad de ARN se cuantificó por absorbancia a 260nm y se cargaron 5 µg (para detectar genes inducidos por estrés) o 10 µg (para *ste11* y *mei2*), previamente mezclados con tampón de carga e incubados 10 min a 65°C, en un gel de agarosa con 6.66% de formaldeído. Para comprobar la carga se visualizó la cantidad de ARN ribosómico por transiluminación del gel y se transfirió el ARN a membranas de nylon cargadas positivamente (GE Healthcare). Luego se hibridó la membrana con sondas específicas marcadas con α P-dCTP mediante el sistema de *random priming* (Roche).

9.2 Transcriptasa reversa seguida de PCR cuantitativa (RT-PCRq)

Se recogieron 25 ml de cultivos en fase exponencial tratados o no según el experimento y los pellets se congelaron a -80°C . Las células se lavaron con 0.5 ml de H_2O Milli-Q (Millipore) y luego se realizó la extracción de ARN mediante fenolización ácida. Para ello, se agregó 0.75 ml de tampón TES (10 mM Tris pH 7.5, 10 mM EDTA pH 8, 0.5% SDS) y las proteínas y el ADN se extrajeron por adición de 0.75 ml de fenol ácido-cloroformo, vórtex e incubación por 1 hora a 65°C . Luego se centrifugó a 21000 xg durante 15 min a 4°C y se extrajo la fase acuosa que fue transferida a un tubo *Phase lock gel* (5Prime). Se realizó una nueva extracción con 0.70 ml de fenol ácido-cloroformo y luego con cloroformo-álcool isoamílico centrifugando 5 min. El ARN de la fase acuosa se precipitó con etanol como se describió para Northern Blot, se resuspendió en 200 μl de H_2O Milli-Q (Millipore) y luego se cuantificó la cantidad de ARN por absorbancia a 260nm. Seguidamente se realizó la purificación de 100 μg de ARN utilizando el kit *RNeasy mini spin columns* con adición de ADNasa (Qiagen). Los pellets de ARN purificados se resuspendieron en 60 μl de H_2O Milli-Q (Millipore).

Para realizar la síntesis de ADNc se utilizaron como molde 2 μg de ARN en un volumen de 9.5 μl , que se incubó 10 min a 70°C , luego se realizó la síntesis utilizando el kit *Reverse Transcription System* (Promega) en un volumen final de 20 μl . La PCR cuantitativa se realizó con los oligonucleótidos descritos en la tabla 4. El análisis cuantitativo se realizó siguiendo el método ΔCt . Calculando la cantidad de ciclos (Ct) a la que se amplifica el ADNc a estudiar de la muestra relativo a una muestra de referencia y a actina. Como control se realizó la síntesis de ADNc pero sin retrotranscriptasa reversa y luego PCRq como con las otras muestras, de manera de evaluar la posible contaminación con ADN.

10. ANÁLISIS DE PROTEÍNAS

10.1 SDS-PAGE y Tinción de plata

Las muestras de proteínas se resolvieron en geles de poliacrilamida/SDS al 8, 10 o 12% siguiendo el método descrito por (Sambrook & Russell 2006c) con un equipo Miniprotean III de BioRad. La tinción con plata de los geles se realizó mediante un método compatible con espectrometría de masas, incubando el gel 2 horas en solución de fijación (50% etanol, 12% ácido acético, 0.0185% formaldehído), se lavó con 50% etanol 3 veces durante 20 min, se incubó con solución sensibilizante (0.02% $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) y luego se lavó inmediatamente con agua destilada dos veces 30 segundos. Luego se incubó por 20 min en solución de plata (0.2%

AgNO₃, 0.028% formaldehído), se lavó nuevamente con agua, se incubó en solución de revelado (3% K₂CO₃, 0.0004% Na₂S₂O₃, 0.0185% formaldehído) y se detuvo la reacción incubando 20 min con glicina 1%. Por último se lavaron los geles 30 min con agua.

10.2 Western Blot

Luego de separar las proteínas mediante SDS-PAGE, los geles se transfirieron a una membrana de PVDF (Immobilon, Millipore) incubada previamente 10 segundos en metanol para su activación. Para la transferencia se utilizó el sistema de transferencia húmeda de BioRad en tampón 25 mM Tris-HCl pH 8, 192 mM glicina y 20% metanol, aplicando un voltaje de 100 V durante 1 hora. Una vez finalizada la transferencia, se realizó la tinción de *Ponceau* para visualizar la carga de proteínas y luego se realizó la detección inmunológica de las proteínas según el método descrito por (Towbin *et al.* 1979). Los anticuerpos utilizados en este trabajo se detallan en la tabla 5.

Tabla 5. Listado de anticuerpos utilizados para Western Blot y CO-IP

Anticuerpo	Tipo	Concentración	Fuente
anti-mouse conjugado a peroxidasa	secundario	1:3000	Amersham
anti-rabbit conjugado a peroxidasa	secundario	1:3000	Amersham
anti-Myc	monoclonal	1:3000	Covance
anti-actina	monoclonal	1:3000	MP Biomedicals
anti-HA	monoclonal	1:3000	Roche
anti-phospho p38	policlonal	1:1000	Cell Signaling
anti-CBP	policlonal	1:1000	GenScript Corp
anti-His	policlonal	1:250	Santa Cruz Biotechnology
anti-ProtA	policlonal	1:200	Sigma-Aldrich
anti-Spc1	policlonal	1:2000	Lab Elena Hidalgo
anti-Ste11	policlonal	1:10000	Lab Elena Hidalgo
anti-PolIII	policlonal	1:1000	Lab Elena Hidalgo
anti-Ser2CTD	policlonal	1:1000	Abcam
anti-Ser5CTD	policlonal	1:1000	Abcam

10.3 Preparación de extractos proteicos con TCA

Se separaron 5 ml de cultivo en fase exponencial tratados o no según el experimento y se agregó 0.55 ml de TCA 100%. Se recogieron las muestras por centrifugación y luego se lavaron con 1 ml de TCA 20%. El pellet resultante se resuspendió en 100 µl de TCA 12.5% y se realizó la ruptura celular mediante perlas de vidrio y 5 min de vórtex a 4° C. Se transfirió el extracto celular a un nuevo tubo mediante punción con una aguja y se centrifugó 20 min a 21000 xg a 4°C para precipitar las proteínas. Luego se realizó un lavado de 1 ml con acetona y

se resuspendió el precipitado seco en 50 µl de Tris 1 M pH 8. Se agregó tampón de carga, se hirvieron las muestras y se realizó SDS-PAGE.

10.4 Purificación de proteínas

a) Purificación de proteínas epitopadas con TAP

- Consideraciones generales

El epítipo TAP se compone de un péptido de unión a Calmodulina (CBP-*calmodulin binding peptide*), un sitio de corte por la proteasa TEV y la proteína A (Fig. 10).

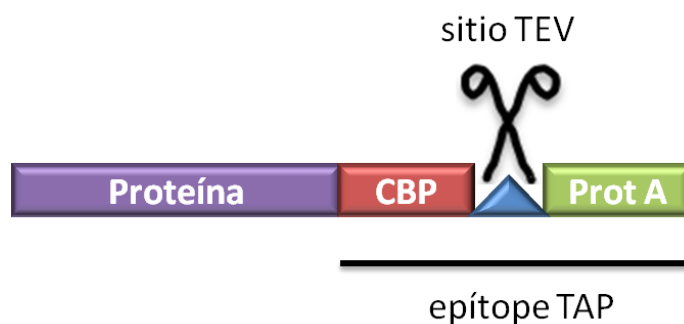


Figura 10. Esquema del epítipo TAP.

La purificación implica tres pasos secuenciales, purificación de proteína A, digestión con la proteasa TEV y purificación con calmodulina. Los experimentos de proteómica de Spc1 y Csx1 se realizaron con los tres pasos secuenciales (Martin *et al.* 2006), el resto de experimentos presentados en la memoria se realizaron hasta la digestión con la proteasa.

- Preparación de extractos nativos de proteína de *S. pombe*

Se recogieron 100 ml de cultivos en fase exponencial tratados o no según el experimento y los pellets se congelaron a -80°C. La lisis celular se realizó a 4°C. Para ello se agregaron 300 µl de tampón de IP completo (20 mM Tris-HCl pH 8.0, 140 mM KCl, 1.8 mM MgCl₂, 0.1% NP40, 1 mM PMSF, 10 µl/ml de cocktail de inhibidores de proteasas (Sigma), ortovanadato sódico 1 mM y NaF 50 mM), se agregaron perlas de vidrio (Ballotini 0.45 mm Braun Biotech) y se realizó vortex (4 x 4 min). Luego se agregó 300 µl de tampón de IP y se traspasó el lisado a un nuevo tubo mediante perforación con una aguja. Se separaron los

extractos lisados de restos celulares mediante dos centrifugaciones a 21000 xg de 10 min y luego se estimó la cantidad de proteína total midiendo la absorbancia a 280nm.

- Purificación

Para la purificación, se incubaron 2 mg de proteínas totales en un volumen de 500 µl con 100 µl de cuentas magnéticas conjugadas a Pan IgG de ratón (Dynabeads®-Invitrogen) en una noria por 2 horas a 4°C. Se reservaron 20 µg de lisado total como INPUT. Previamente, las bolitas magnéticas fueron lavadas con tampón de IP (3 x 1 ml) (20 mM Tris-HCl pH 8.0, 140 mM KCl, 1.8 mM MgCl₂, 0.1% NP40), incubadas en una noria durante 16 horas a 4°C con 3 µl de anticuerpo α-ProtA y lavadas nuevamente con 1 ml de tampón de IP completo y resuspendidas en 100 µl de tampón de IP completo. Luego se realizaron los lavados utilizando un imán (DynaMag™-2-Invitrogen), primero se realizaron 2 lavados rápidos, 1 lavado en una noria por 15 min a 4°C y un último lavado rápido con tampón de lavado (20 mM Tris-HCl pH 8.0, 140 mM KCl, 1.8 mM MgCl₂, 0.04% NP40, 10% glicerol) más PMSF 1 mM y luego se realizaron cuatro lavados de 15 min con tampón de lavado más DTT 1 mM. La elución de los extractos purificados se realizó incubando las bolitas magnéticas en 25 µl de tampón de lavado con DTT 1 mM más 20 unidades de proteasa AcTEV™-Invitrogen por 80 min a temperatura ambiente, resuspendiendo cada 10 min. Para los experimentos de copurificación (Co-IP), se cargaron 15 µl de eluido con tampón de carga en geles de poliacrilamida-SDS y como INPUT 20 µg de lisado total. La cuantificación de bandas se realizó por densitometría.

b) *Purificación de proteína epitopadas con HA y Myc*

Para conseguir la purificación de proteínas epitopadas con HA o con Myc, se realizó el mismo protocolo de purificación de TAP, pero incubando 100 µl de resina Pan IgG de ratón (Dynabeads®-Invitrogen) previamente con 1 µl de α-HA o α-Myc por muestra. Luego de los lavados, se agregó tampón de carga, se hirvió 5 min y se cargaron las muestras en geles SDS-PAGE.

c) *Purificación de proteínas epitopadas con cola de histidinas*

- Preparación de extractos de proteína de *S. pombe* en condiciones desnaturalizantes

Se recogieron 20-30 ml de cultivos en fase exponencial tratados o no según el experimento y los pellets se congelaron a -80°C. Para la ruptura y lisis celular, se agregó 200-300 µl de tampón G (6 M Cloruro de guanidinio, 100 mM tampón fosfato pH 8, 50 mM Tris HCl pH 8), perlas de vidrio y se realizó vortex (2 x 4 min). Luego se traspasó el lisado a un nuevo tubo mediante perforación con una aguja. Se separaron los extractos lisados de restos

celulares mediante centrifugación a 21000 xg por 15 min y luego se estimó la cantidad de proteína total midiendo la absorbancia de la muestra a 280nm.

- Purificación

Se incubó en un volumen de 500 µl, 200 µg de proteínas totales (experimentos de fosforilación de Spc1 y Atf1) o 1 mg de proteínas totales (ubiquitinación de Spc1) con 30 µl-50 µl de resina de Níquel (Ni-NTA-Agarose, Qiagen) previamente equilibrada en tampón G, por 1 hora a temperatura ambiente en rotación. Luego se realizaron 3 lavados de 1 ml con tampón U (8 M Urea, 100 mM tampón fosfato pH 8, 50 mM Tris HCl pH 8), se agregó tampón de carga, se hirvió 5 min y se cargaron las muestras en geles SDS-PAGE.

d) *Purificación de proteínas expresadas en E. coli*

Se utilizaron cultivos de Rosetta gami (DE3) transformados con los plásmidos de expresión pRSET o pGEX, se realizó la inducción con IPTG 0.3 mM 3 horas a 23°C de 0.5-1 litros de cultivos en fase exponencial DO₆₀₀:0.5. Las células se recogieron por centrifugación, se lavó una vez con 1 volumen de PBS frío (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄ • 2 H₂O, 2 mM KH₂PO₄ a pH 7.4) y los pellets se congelaron a -80°C.

- Preparación de extractos proteicos

Se agregaron 30 ml de tampón de lisis (PBS más 1 mM DTT, 1 mg/ml lisozima, 1 mM PMSF), se resuspendieron los pellets y se incubó en hielo 30 min. Luego se sonicó 3 veces 20 segundos a 60% de potencia (Labsonic® M Sartorius). Se agregó 1% Tritón X-100 y se incubó 5 min en agitación. Los lisados se separaron de los restos celulares por centrifugación a 10000 xg 15 min dos veces y se cuantificó la cantidad de proteína midiendo la Abs a 280nm.

- Purificación de GST o Histidinas

Para la purificación, se incubaron 30 mg de proteínas totales con 500 µl de resina glutatión-agarosa para purificar GST o resina de Níquel (Ni-NTA-Agarose, Qiagen) para purificar histidinas, por 16 horas a 4°C en columnas EconoPac™ (Bio-Rad). Luego se realizaron 4 lavados con 20 ml de PBS. La elución se realizó en 1 ml de tampón de lisis con 10 mM glutatión para GST o 250 mM imidazol para His. Las proteínas purificadas se concentraron precipitando con 10% TCA 16 horas a 4°C, se lavó dos veces con acetona fría y el pellet seco se resuspendió en tampón de carga para geles SDS-PAGE.

10.5 Inmunopurificación de cromatina (ChIP)

Esta técnica permite estudiar si una proteína se une directamente a las diferentes regiones de un gen. Consiste en realizar *crosslinking* para mantener las uniones proteína-ADN, luego realizar una inmunopurificación (IP) con anticuerpos específicos de la proteína a estudiar y por último se analiza por PCRq si las regiones de ADN de interés han sido copurificadas.

- Crosslinking

A 50 ml de cultivo en medio mínimo en fase exponencial tratado o no según el experimento, se agregó 1-1.5% de formaldehído durante 20 min a 25°C y luego 125 mM de glicina durante 5 min a 25°C. Se recogieron las células por centrifugación a 4°C y luego se lavaron dos veces con PBS frío y los pellets se congelaron a -80°C.

- Preparación de extractos

La ruptura celular se realizó agregando 250 µl de tampón de ruptura (0.1 M Tris-HCl pH 8, 2% glicerol y 1 mM PMSF) y perlas de vidrio en una FastPrep™ 2x 45s nivel 4.5. Los extractos se pasaron a otro tubo mediante punción con aguja y se realizaron dos lavados (0.5 ml y 1 ml) con tampón de lisis (50 mM Hepes pH 7.5, 140 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Triton X-100, 0.1% deoxicolato de sodio, 0.1% SDS, 1mM PMSF) y luego se resuspendieron las muestras en 250 µl de tampón de lisis. Se sonicó 12 min (8 ciclos, nivel H, ON 0.5 min, OFF 1min) de manera de obtener fragmentos de cromatina de 400 pb. Luego se agregó 750 µl de tampón de lisis y se centrifugó 21000 xg 30 min a 4°C para descartar los restos celulares. Se separaron 50 µl del lisado como INPUT y los 950 µl restantes se utilizaron para la IP.

- Inmunopurificación

Para la IP, se agregó 1 µl del anticuerpo (α -HA, α -PolII, α -Ser2, α -Ser5) y 10 µl proteína G agarosa previamente equilibrada en tampón de lisis y se incubó a 4°C en rotación 16 horas. Luego se realizaron lavados de 5 min a temperatura ambiente con 1 ml de tampón. Los lavados realizados fueron: 1 lavado con tampón de lisis, 2 lavados con tampón de lisis más 360 mM NaCl, 2 lavados con tampón de lavado (10 mM Tris pH 8. 0.25 M LiCl, 0.5% NP40, 0.5% deoxicolato de sodio, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF), 1 lavado con TE. Para la elución se agregó a la resina 100 µl de tampón de elución (50 mM Tris pH 7.5, 10 mM EDTA pH 8 y 1% SDS) y se incubó 20 min a 65°C y luego los sobrenadantes (IPs) se transfirieron a un nuevo tubo.

- Reversión del *crosslinking* y purificación de ADN

Para revertir el *crosslinking* se agregó 150 µl de TE/0.67% SDS a las IPs e INPUTS y se incubó 16 horas a 65°C. Después, para purificar el ADN, se agregó 250 µl de TE, 1 µl de glicógeno (20 mg/ml), 7.5 µl de proteinasa K (20 mg/ml) y se incubó 2 horas a 37°C. Luego se

agregó 12.5 µl de NaCl 5M y se realizó la extracción fenol/cloroformo del ADN. Para ello se agregaron 500 µl de fenol/cloroformo, se centrifugo 5 min a 4°C y se transfirió la fase acuosa a un nuevo tubo, este paso se realizó dos veces y luego se precipitó el ADN de la fase acuosa con 1 ml de Etanol 100% frío 1 hora a -20 ° C. Los pellets de ADN se secaron y se resuspendieron en 100 µl de TE.

- PCRq

Para la PCRq, se utilizó como molde 1 µl de cada IP y 1 µl de una dilución 1/10 de los INPUTS. Los oligonucleótidos utilizados a una concentración 1.5 µM están descriptos en la tabla 4. Se utilizó el equipo Light cycler 480. El análisis cuantitativo se realizó siguiendo el método ΔC_t (C_t INPUT- C_t IP). Se obtuvo la cantidad de ciclos (C_t) a la que se amplifica la región de ADN a estudiar y luego se calcularon los porcentajes de proteína inmunopurificada relativo al INPUT como: $(\text{eficiencia de oligonucleótidos}^{C_t \text{ input}-C_t \text{ IP}})/2$. La eficiencia de cada par de oligonucleótidos (E) utilizado en la reacción de PCR se calculó realizando diluciones seriadas (dil) de una muestra silvestre y calculando la pendiente de la recta, $C_t: E \ln(\text{dil}) + b$.

10.6 Ensayo kinasa

Se recogieron 100 ml de cultivos en fase exponencial $DO_{600}:0,5$ tratados o no con KCl 0.6 M 15 min para activar la fosforilación de Spc1. Se realizó la inmunopurificación de Spc1:TAP y de los sustratos epitopados con HA según el protocolo descrito de purificación de proteínas (sección 10.4). Para la reacción kinasa se mezclaron 10 µl de sustrato resuspendido en tampón kinasa 2X (100mM Tris-HCl pH 8, 20 mM MgCl, 4 mM DTT) con 10 µl de kinasa (de elución TAP) más 10 µCi de $\gamma\text{-}^{32}\text{P}$ -ATP (Perkin Elmer). Se incubó 25 min a 30°C mezclando cada 5 min, se agregó tampón de carga e hirvieron las muestras y se realizó SDS-PAGE y tinción de plata.

11. ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO

11.1 Alineamientos múltiples

Los alineamientos múltiples se realizaron utilizando la herramienta *Constraint-based Multiple Alignment Tool* (COBALT) y se visualizaron los árboles filogenéticos con COBALT *Phylogenetic Tree View* y los alineamientos múltiples con *Jalview 2.8 BLOSUM 62 SCORE*.

RESULTADOS

1. INTERACCIÓN DE LA MAPK SPC1 CON EL COMPLEJO CCR4-NOT

1.1 Búsqueda de proteínas que interaccionan con Spc1 y con Csx1

Una de las maneras de conocer el papel funcional de una proteína, es estudiar las proteínas que interaccionan con ella. Para encontrar candidatos que sean relevantes para la respuesta a estrés en *S. pombe*, realizamos la purificación de la MAPK Spc1 mediante TAP. Además, para estudiar la relación entre Spc1 y Csx1, realizamos la purificación de Csx1 para, de esta manera, identificar proteínas candidatas que interaccionen con ambas proteínas y que confieran un posible nexo funcional y/o estructural entre Spc1 y Csx1.

Previamente en el laboratorio se realizó la purificación de Spc1 y de Csx1 por TAP en condiciones basales o de estrés oxidativo y se detectaron las proteínas copurificadas mediante espectrometría de masas (MS).

El epítipo TAP permite una purificación secuencial que implica tres pasos de purificación (ver Materiales y Métodos) y por lo tanto es uno de los métodos más fiables para estudiar interacciones bioquímicas en condiciones similares a las fisiológicas.

Al analizar los resultados de estos experimentos de proteómica, decidimos tomar en cuenta a las proteínas copurificadas en las que se detectaron por espectrometría de masas por lo menos 2 péptidos diferentes. De esta manera obtuvimos 233 proteínas candidatas de interaccionar con Spc1 y 66 proteínas para Csx1, y 13 coincidentes en ambas. En las tablas 6 y 7 se detallan los *Gene Ontology terms* (GO terms) de las proteínas identificadas copurificando con Spc1 y tanto con Spc1 como Csx1.

Proceso Biológico	Frecuencia en la muestra	Frecuencia en el proteoma
GO:0000165 MAPKKK cascade	5/86 (5.8%)	20/5180 (0.4%)
GO:0007243 protein kinase cascade	5/86 (5.8%)	21/5180 (0.4%)
GO:0051238 sequestering of metal ion	2/86 (2.3%)	2/5180 (0.0%)
GO:0006880 intracellular sequestering of iron ion	2/86 (2.3%)	2/5180 (0.0%)
GO:0006796 phosphate metabolic process	15/86 (17.4%)	334/5180 (6.4%)
GO:0006793 phosphorus metabolic process	15/86 (17.4%)	334/5180 (6.4%)
GO:0016310 phosphorylation	13/86 (15.1%)	264/5180 (5.1%)
GO:0006855 multidrug transport	2/86 (2.3%)	3/5180 (0.1%)
GO:0043412 biopolymer modification	22/86 (25.6%)	672/5180 (13.0%)
GO:0006468 protein amino acid phosphorylation	8/86 (9.3%)	130/5180 (2.5%)
GO:0009070 serine family amino acid biosynthetic process	3/86 (3.5%)	14/5180 (0.3%)
GO:0055085 transmembrane transport	13/86 (15.1%)	331/5180 (6.4%)
GO:0015893 drug transport	2/86 (2.3%)	7/5180 (0.1%)
GO:0006544 glycine metabolic process	2/86 (2.3%)	8/5180 (0.2%)
GO:0007088 regulation of mitosis	4/86 (4.7%)	48/5180 (0.9%)
GO:0006464 protein modification process	18/86 (20.9%)	598/5180 (11.5%)
GO:0043687 post-translational protein modification	15/86 (17.4%)	463/5180 (8.9%)
GO:0006563 L-serine metabolic process	2/86 (2.3%)	9/5180 (0.2%)
GO:0010564 regulation of cell cycle process	6/86 (7.0%)	109/5180 (2.1%)
GO:0051783 regulation of nuclear division	4/86 (4.7%)	50/5180 (1.0%)
GO:0009069 serine family amino acid metabolic process	3/86 (3.5%)	27/5180 (0.5%)
GO:0009451 RNA modification	5/86 (5.8%)	78/5180 (1.5%)

Tabla 6. GO Terms de proteínas copurificadas con Spc1. Se realizó la búsqueda de los GO Terms de las proteínas copurificadas en las cuales se identificaron más de 2 péptidos diferentes.

Proceso Biológico	Frecuencia en la muestra	Frecuencia en el proteoma
GO:0010467 gene expression	10/14 (71.4%)	1470/5180 (28.4%)
GO:0016070 RNA metabolic process	8/14 (57.1%)	922/5180 (17.8%)
GO:0016043 cellular component organization	9/14 (64.3%)	1210/5180 (23.4%)
GO:0016071 mRNA metabolic process	4/14 (28.6%)	219/5180 (4.2%)
GO:0032543 mitochondrial translation	3/14 (21.4%)	123/5180 (2.4%)
GO:0006996 organelle organization	7/14 (50.0%)	927/5180 (17.9%)
GO:0051028 mRNA transport	2/14 (14.3%)	54/5180 (1.0%)
GO:0006406 mRNA export from nucleus	2/14 (14.3%)	54/5180 (1.0%)
GO:0006397 mRNA processing	3/14 (21.4%)	171/5180 (3.3%)
GO:0006402 mRNA catabolic process	2/14 (14.3%)	57/5180 (1.1%)

Tabla 7. GO Terms de proteínas copurificadas con Spc1 y con Csx1. Se realizó la búsqueda de los GO Terms de las proteínas copurificadas con Spc1 y Csx1 en las cuales se identificaron más de 2 péptidos diferentes.

Uno de los candidatos más interesantes fue la proteína Not1, de la cual se detectaron 4 péptidos diferentes copurificando con Spc1 en condiciones de estrés oxidativo, 2 péptidos diferentes en condiciones basales y para Csx1 2 péptidos diferentes en condiciones de estrés oxidativo.

La proteína Not1 pertenece al complejo Ccr4-Not y es el principal componente *scaffold* del complejo. Not1, además de ser una proteína esencial en todos los eucariotas estudiados, es un componente estructural clave del complejo e interacciona directamente, con la mayoría de los componentes del mismo. Además, la relevancia de este complejo en la respuesta a estrés no ha sido estudiada en *S. pombe* ni otros organismos hasta el momento. Como ha sido descrito en la Introducción, el complejo participa en varios de los eventos de regulación de la síntesis de nuevas proteínas, desde el control de la síntesis de ARNm, degradación de ARNm hasta degradación de proteínas.

Por lo tanto, este complejo es un candidato muy interesante a participar en la respuesta a diferentes estímulos y posiblemente a dar especificidad para responder a cada estrés de manera coordinada.

1.2 Not1 y el complejo Ccr4-Not está conservado en *S. pombe*

Para comprobar el grado de conservación de la proteína Not1 y el complejo Ccr4-Not en *S. pombe* con respecto a otros eucariotas, evaluamos por alineamiento múltiple las secuencias de la proteína Not1 y del resto de los componentes del complejo Ccr4-Not (Not2, Not3, Not4, Ccr4, Caf1, Caf40) de *S. cerevisiae*, *S. pombe*, *D. melanogaster* y *H. sapiens*.

La conservación de todos los componentes del complejo es alta como se observa en la Figura 11. Se observa también que la proteína Not1 de *S. pombe* es más similar a la secuencia de eucariotas superiores que la de *S. cerevisiae*.

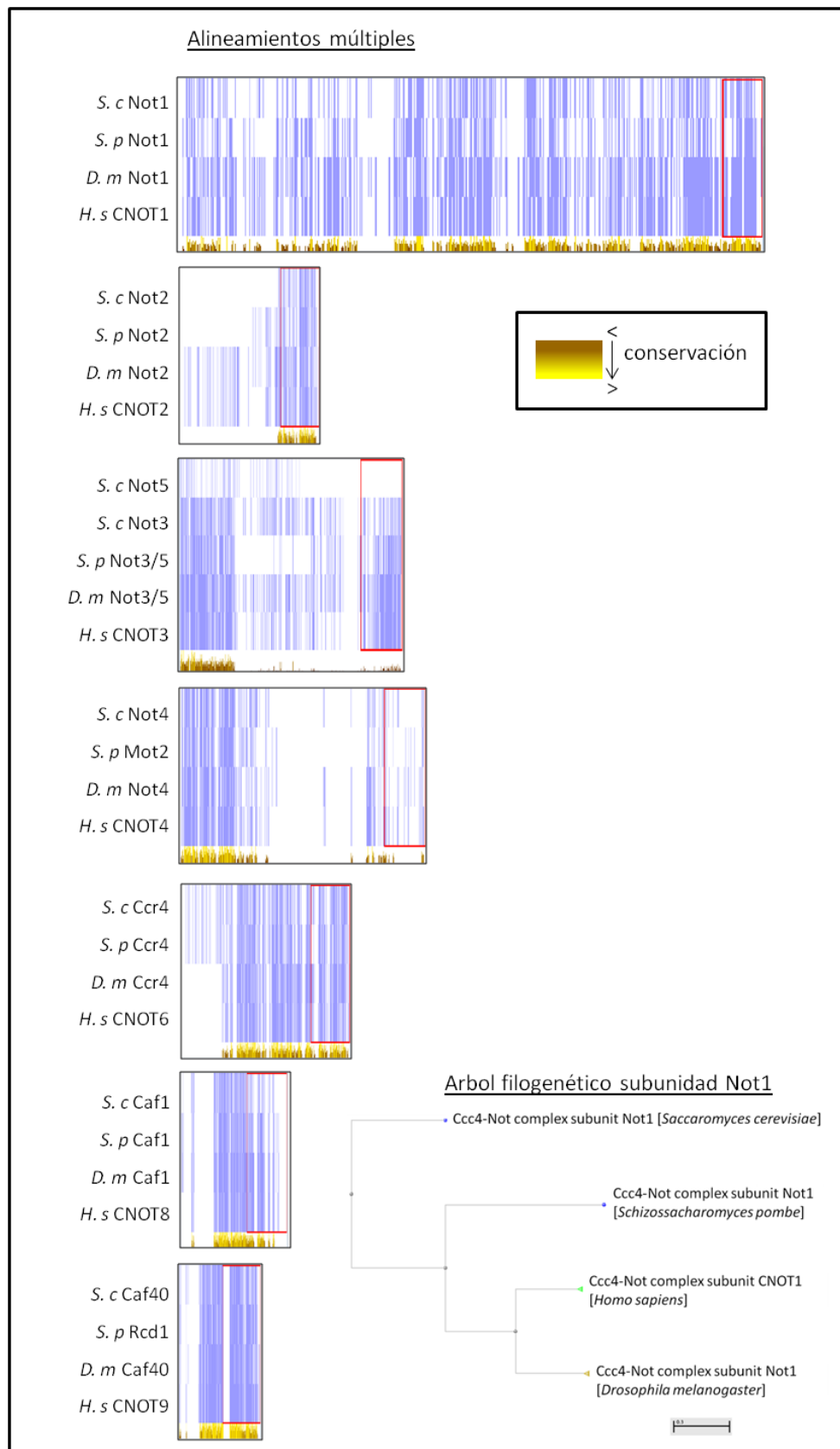


Figura 11. Conservación del complejo Ccr4-Not en eucariotas. Alineamientos múltiples y posible árbol filogenético basado en las secuencias de proteína de *S. cerevisiae* (*S. c*), *S. pombe* (*S. p*), *D. melanogaster* (*D. m*) y *H. sapiens* (*H. s*). A la izquierda se observa el nombre de cada componente del complejo Ccr4-Not en cada organismo.

1.3 *Spc1* y *Not1* se asocian *in vivo*

Para comprobar la interacción de Spc1 con Not1 detectada por proteómica, se realizó la copurificación (Co-IP) de ambas proteínas utilizando los epítomos TAP y HA. Se realizó la purificación de Spc1:TAP y luego la detección de Not1:HA por Western Blot (WB). Como control negativo se realizó la misma purificación pero en una cepa sin Spc1:TAP. Además, para observar la especificidad de la purificación se realizó SDS-PAGE y tinción de plata. Al purificar Spc1, observamos que Not1 copurifica detectándose diferentes bandas (Fig. 12).

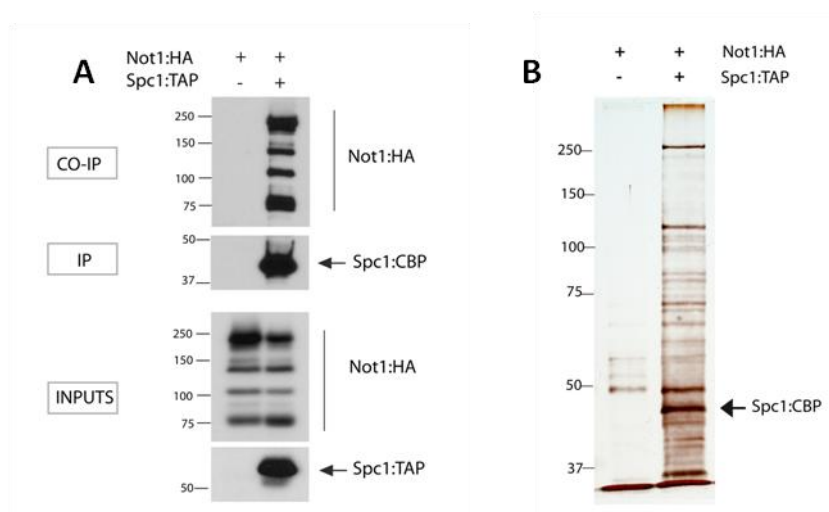


Figura 12. *Spc1* y *Not1* copurifican *in vivo*. A. Se recogieron cultivos en fase exponencial (DO_{600} : 0.5) y se realizó la purificación de Spc1:TAP y luego se detectó Not1:HA copurificada por WB. INPUTS: lisados totales. B. Luego de la purificación de Spc1:TAP se realizó SDS-PAGE y tinción de plata. Spc1:CBP corresponde a Spc1 purificada luego de la digestión con la proteasa TEV.

Gracias a estos resultados comprobamos que Spc1 y Not1 se asocian *in vivo*. La detección de varias bandas de Not1 se debe a la degradación experimental de Not1. Además, como se observa en la tinción de plata, la purificación de Spc1 es bastante específica y presenta una gran cantidad de proteínas copurificadas que no se detectan en el control negativo. Sin embargo, es muy común que las Co-IP arrojen falsos positivos debido a la unión inespecífica de las proteínas copurificadas a la resina de IgG en este caso o al epítomo TAP. Por este motivo realizamos controles de Co-IP que se detallan a continuación.

1.4 Controles de copurificación

Para comprobar que la Co-IP es específica y que Spc1 y Not1 interaccionan fisiológicamente realizamos diferentes controles. Primero, realizamos la purificación reversa,

purificando Not1:TAP y detectando la proteína Spc1:HA copurificada mediante WB. Además, incluimos un control positivo de Co-IP, purificando Spc1:TAP y observamos que copurifica Srk1:HA, uno de los sustratos de Spc1. Por último, realizamos la Co-IP con otros epítomos, purificando Spc1:Myc y detectando Not1:HA copurificada (Fig. 13).

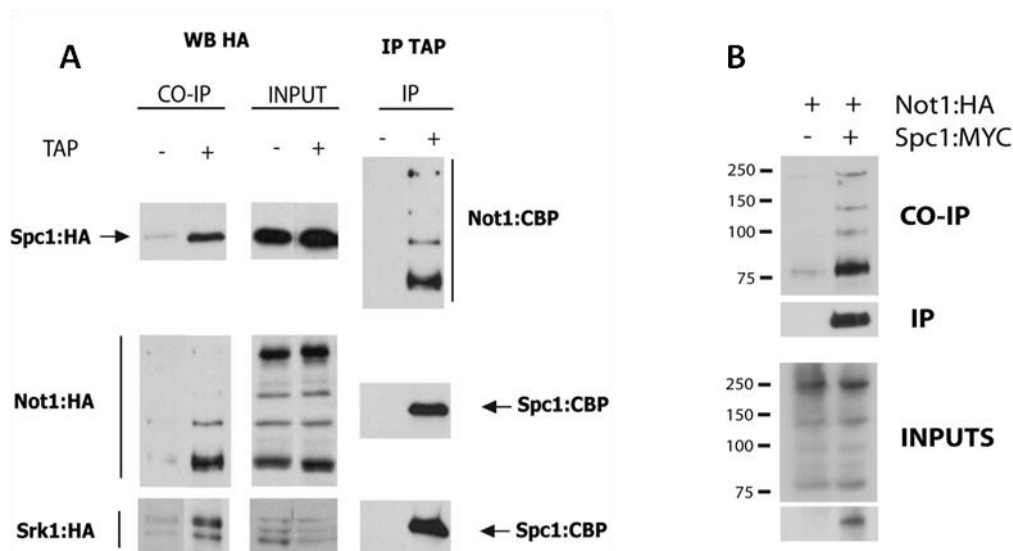


Figura 13. Controles de copurificación. A. Purificación de Not1:TAP y detección de Spc1:HA por Western Blot, purificación de Spc1:TAP y detección de Not1:HA por Western Blot y purificación control positivo de Spc1:TAP y detección de Srk1:HA por WB. B. purificación de Spc1:MYC y detección de Not1:HA por WB. INPUTS: lisados totales.

Los resultados indican que la asociación de Spc1 y Not1 es específica y no depende de factores experimentales. Por lo tanto, nuestros experimentos sugieren que estas proteínas interactúan *in vivo*.

1.5 La interacción Spc1/Not1 se mantiene en condiciones de estrés

Spc1 es la MAPK que media la señalización de respuesta a estrés en *S. pombe*. Para conocer si la interacción de Spc1 y Not1 se mantiene en condiciones de estrés, tratamos los cultivos en fase exponencial con 1 mM de H₂O₂ por 15 min para generar estrés oxidativo o con 0.6 M de KCl por 15 min para generar estrés osmótico y realizamos el experimento de Co-IP purificando Spc1:TAP y detectando Not1:HA por WB.

De esta manera estudiamos si la asociación de Not1 y Spc1 es dependiente del estado de estrés de la célula. Como se puede observar en la Figura 14, la interacción entre Not1 y Spc1 se mantiene tanto en condiciones basales como de estrés oxidativo u osmótico.

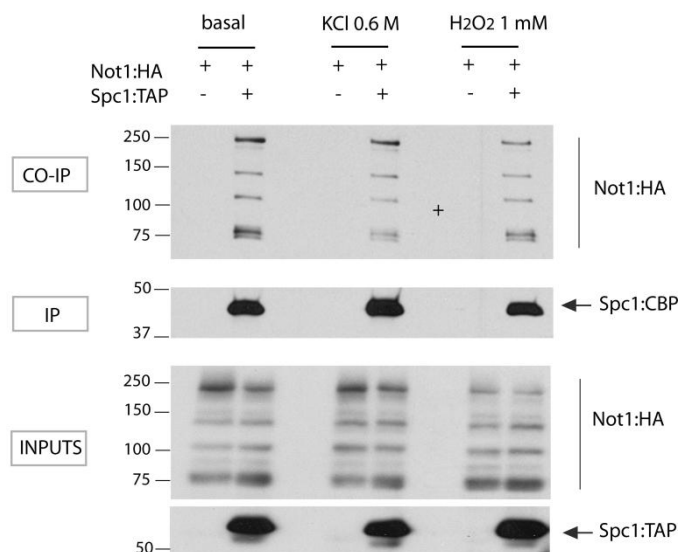


Figura 14. Spc1 y Not1 co-purifican en condiciones de estrés osmótico y oxidativo. Se cultivaron las células hasta fase exponencial (DO_{600} :0.5) en medio rico y se realizó el tratamiento con 0.6 M de KCl por 15 min o 1 mM de H₂O₂ por 15 min. Luego se realizó la purificación de Spc1:TAP y se detectó Not1:HA copurificada por WB. INPUTS: lisados totales.

La interacción de Not1 y Spc1 se mantiene también en condiciones de estrés lo que podría implicar que tanto Not1 como el complejo Ccr4-Not del cual Not1 es el componente *scaffold* tengan un papel en la respuesta a estrés mediada por Spc1.

1.6 Csx1 y Not1 copurifican en condiciones basales y de estrés

Dado que Not1 coipurificó con Spc1 y con Csx1 en los experimentos de proteómica, estudiamos, de la misma manera que con Spc1, la interacción de Csx1 y Not1 por copurificación en condiciones basales o de estrés. Para ello, se trataron los cultivos con 1 mM de H₂O₂ por 15 min (estrés oxidativo) o 0.6 M de KCl por 15 min (estrés osmótico) y se realizó la purificación de Csx1:TAP y detección de Not1:HA por WB.

Observamos que efectivamente Csx1 y Not1 copurifican en condiciones basales y que al igual que con Spc1, esta interacción se mantiene en estrés (Fig. 15).

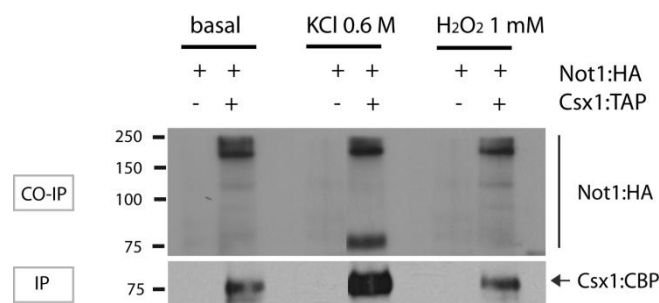


Figura 15. Csx1 y Not1 co-purifican en condiciones de estrés osmótico y oxidativo. Se cultivaron las células hasta fase exponencial (DO_{600} : 0.5) en medio rico y se realizó el tratamiento con 0.6 M de KCl por 15 min o 1 mM de H_2O_2 por 15 min. Luego se realizó la purificación de Csx1:TAP y se detectó Not1:HA copurificada por WB. INPUTS: lisados totales.

La copurificación de Csx1 y Not1 valida los resultados obtenidos por proteómica. Tanto Spc1 como Csx1 interactúan con Not1 y esta interacción se mantiene en condiciones de estrés.

1.7 Interacción directa entre Spc1 y Not1

Para estudiar si la interacción de Not1 con Spc1 es directa, decidimos realizar la copurificación *in vitro* de estas dos proteínas. Para ello utilizamos los vectores pRSET-C (para purificar proteínas fusionadas a Histidinas) y pGEX (para purificar proteínas fusionadas a GST) donde clonamos las secuencias codificantes de Not1 y Spc1 respectivamente. Dado que la región codificante (ORF) de *not1* es de gran tamaño (6.3 kb) la dividimos en cuatro regiones que clonamos en pRSET-C. Las regiones se eligieron según las zonas conservadas de la proteína evidenciadas en el alineamiento múltiple (Fig. 11).

Así se construyeron cuatro plásmidos, pRSET-not1-0:His (con la región comprendida entre los aminoácidos 0 y 635), pRSET-not1-635:His (con la región comprendida entre los aminoácidos 635 y 1117), pRSET-not1-1117:His (con la región comprendida entre los aminoácidos 1117 y 1455) y pRSET-not1-1455:His (con la región comprendida entre los aminoácidos 1455 y 2100).

Se transformaron los plásmidos en la cepa de *E. coli* Rosetta-gami2 para su expresión y se realizó la purificación de los distintos fragmentos de Not1:His y de Spc1:GST para luego realizar nuevamente la purificación de Spc1:GST y observar si los fragmentos de Not1 copurifican. Por Western Blot se detectó que los fragmentos Not1-0 y Not1-635 copurificaron con Spc1, aunque también hubo una leve copurificación en el control negativo de Not1-0 (Fig. 16).

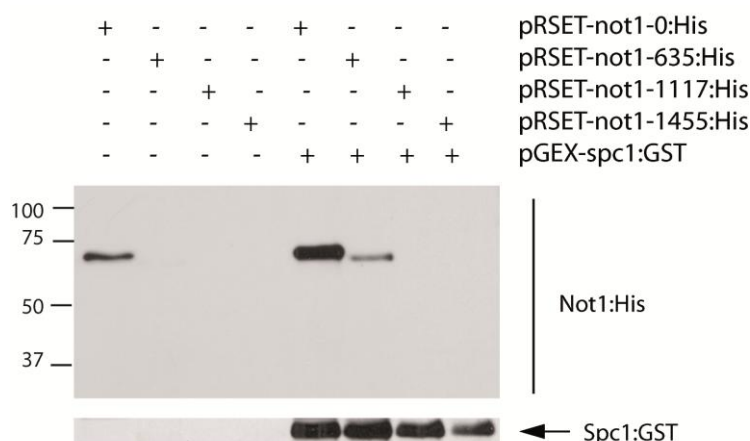


Figura 16. Copurificación in vitro de Spc1 y Not1. Cultivos de Rosetta gami2 transformada con los plásmidos pRSET-not1-0:His, pRSET-not1-635:His, pRSET-not1-1117:His, pRSET-not1-1455:His o pGEX-spc1:GST fueron inducidos con IPTG 0.3 mM por 4 horas a 23°C y luego se realizó la purificación de Not1:His con resinas de Níquel y de Spc1:GST con resinas de glutatión agarosa. Seguidamente se mezclaron partes iguales de los extractos de Not1:His y Spc1:GST y se realizó una segunda purificación de Spc1:GST y detección de Not1:His por WB. Spc1:GST se detectó con un anticuerpo α -Spc1.

Este experimento indica que posiblemente Not1 y Spc1 tengan una interacción directa en la zona N-terminal de Not1. Esto implica que Spc1 podría ser un componente más del complejo Ccr4-Not, al que pertenece y del que es andamiaje Not1.

1.8 La interacción de Not1 con Spc1 depende de otros componentes del complejo

Para estudiar si Spc1 interacciona sólo con Not1 o si interacciona con otros componentes del complejo, estudiamos la copurificación de Not1 y Spc1 en diferentes mutantes de delección de los componentes del complejo. Dado que Not1 es el componente *scaffold* del complejo, planteamos la hipótesis de que la interacción de Spc1 con Not1 podría estar mediada o regulada por otras proteínas del complejo que tuvieran funciones específicas en la respuesta a estrés.

Utilizando la colección de mutantes de Bioneer (ver Materiales y Métodos), estudiamos la copurificación de Spc1:TAP y Not1:HA en cepas deficientes en los componentes del complejo Ccr4-Not como *not2*, *not3*, *mot2*, *ccr4*, *caf1*, y *rcd1*, en proteínas asociadas como *caf4*, *caf16*, *btf3* y en componentes de otros complejos que interaccionan fuertemente con Ccr4-Not como las subunidades del complejo Mediador *srb9*, *srb10*, *srb11* y *pmc2* y *ada2* del complejo SAGA basándonos en lo descrito para *S. cerevisiae*. Además incluimos la cepa de delección en *csx1*, por su demostrada interacción con Not1 (Resultados 1.6)

Observamos que la copurificación de Not1 con Spc1 aumenta en los mutantes *mot2Δ*, *caf16Δ* y *rcd1Δ*. Por el contrario, la copurificación de Not1 con Spc1 disminuye en los mutantes *caf1Δ*, *ccr4Δ*, *ada2Δ*, *srb10Δ*, *btf3Δ* y *csx1Δ* (Fig. 17).

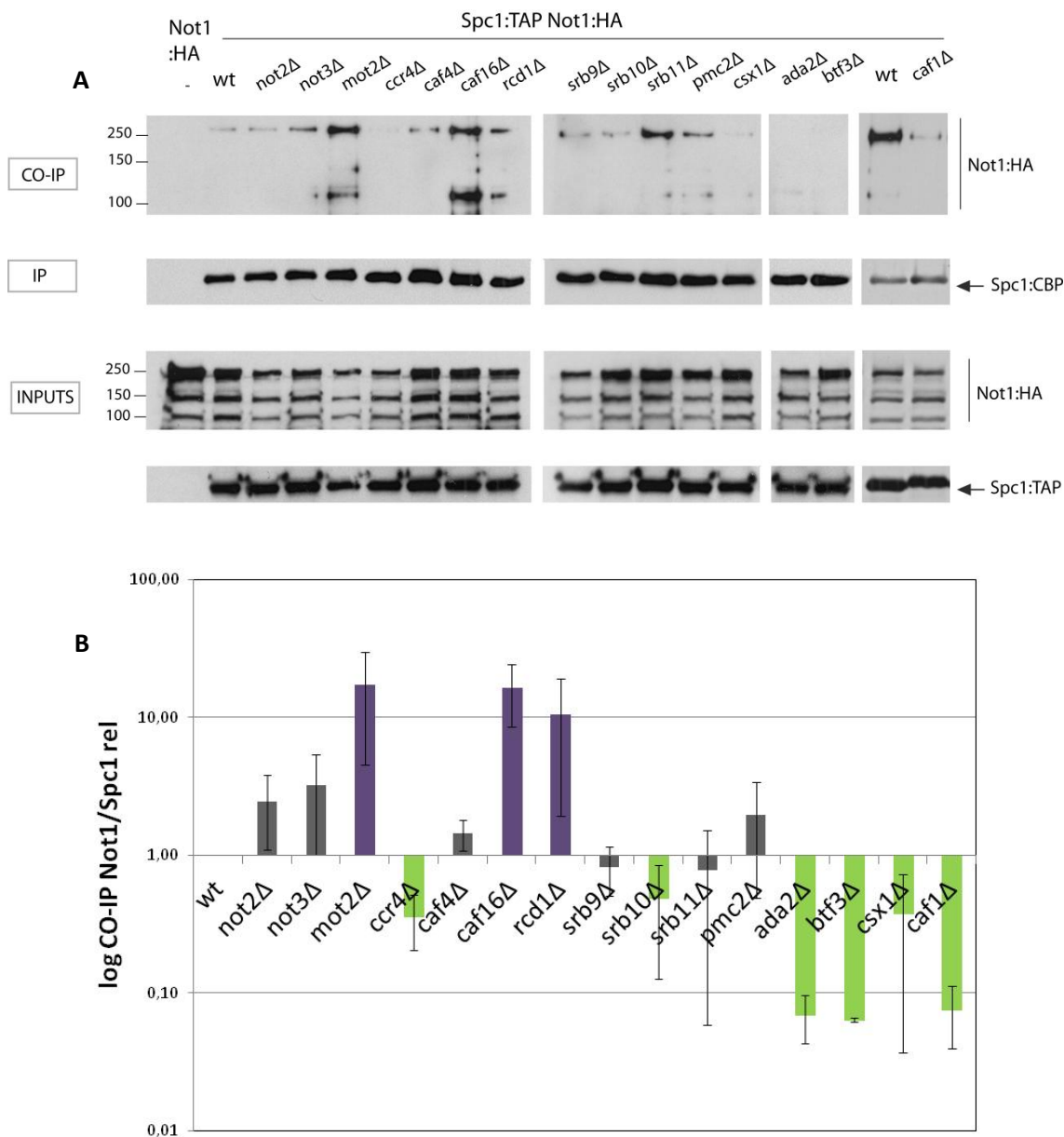


Figura 17. Interacción de Spc1 y Not1 en distintas cepas mutantes de componentes del complejo Ccr4-Not. A. Experimento representativo de Co-IP de Spc1 y Not1 en mutantes de delección de los componentes del complejo Ccr4-Not y de proteínas que interaccionan con el mismo. Se recogieron cultivos en fase exponencial y se purificó Spc1:TAP y luego se detectó Not1:HA por WB en cepas delecionadas en los componentes del complejo Ccr4-Not. B. Cuantificación de las Co-IPs de Not1 con Spc1 en los mutantes del complejo Ccr4-Not y de proteínas que interaccionan con el mismo. Se realizaron por lo menos 3 experimentos independientes y se cuantificó por densitometría la cantidad de Not1 copurificada y se normalizó con respecto a la cantidad de Spc1 purificada y a sus respectivos INPUTS. Barras azules: Not1 copurifica en mayor cantidad que la cepa silvestre, Barras verdes: Not1 copurifica en menor cantidad que la cepa silvestre.

Los cambios en la copurificación de Not1 con Spc1 pueden ser explicados por dos alternativas. Si otra proteína del complejo estuviera favoreciendo la unión de Not1 con Spc1, o mediando la unión entre estas proteínas, entonces su delección generaría una disminución en la Co-IP de Not1 y Spc1. La segunda alternativa es que otra proteína estuviera compitiendo por el sitio de unión de Spc1 con Not1, en cuyo caso su delección implicaría un aumento en la Co-IP de Not1 y Spc1.

Los resultados indicaron que en la interacción de Spc1 con Not1 estarían sucediendo ambas alternativas. Lo que nos resultó más interesante es que Spc1 estaría interaccionando con otros componentes del complejo Ccr4-Not además de Not1, como podrían ser las deadenilasas Caf1 y Ccr4, con Btf3, con la proteína Ada2 que pertenece al complejo SAGA y con Srb10 un componente del complejo Mediador. Por su parte, es interesante que la delección de Csx1, disminuya la Co-IP de Not1 con Spc1 lo que indica que Csx1 estaría mediando o favoreciendo la interacción de Spc1 con Not1.

2. IMPORTANCIA DE LOS COMPONENTES DEL COMPLEJO CCR4-NOT EN LA RESPUESTA A ESTRÉS

2.1 Ensayos de sensibilidad a estrés osmótico, oxidativo y alta temperatura

Dado que Spc1 interacciona con Not1 y posiblemente con otros componentes y proteínas asociadas al complejo Ccr4-Not, nos preguntamos si estas proteínas son necesarias para la respuesta a estrés mediada por Spc1. Para ello, realizamos ensayos de viabilidad para estudiar la sensibilidad de cepas deficientes en los diferentes componentes del complejo en respuesta a distintos estímulos como: agentes oxidantes (peróxido de hidrógeno), sales que generan estrés osmótico (cloruro de potasio) y alta temperatura (40°C o 37°C).

Los resultados mostraron que las cepas *caf1Δ*, *ccr4Δ*, *mot2Δ*, *ada2Δ*, *srb10Δ* y *btf3Δ*, fueron sensibles a estrés osmótico y oxidativo. Las cepas *not2Δ*, *not3Δ* fueron sensibles únicamente a estrés osmótico (Fig. 18).

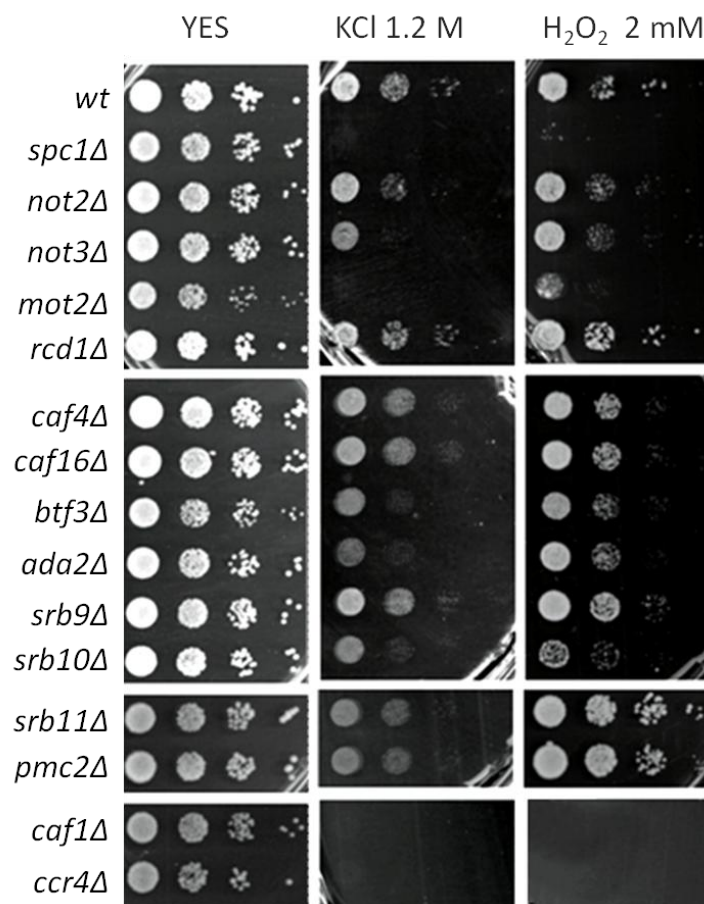


Figura 18. Varios mutantes de delección de los componentes del complejo Ccr4-Not son sensibles a estrés. Las cepas delecionadas en *spc1* o en los componentes del complejo Ccr4-Not y proteínas asociadas fueron cultivadas en medio rico hasta fase exponencial y luego se realizaron diluciones seriadas y ensayo de goteo en placas de medio rico con diferentes concentraciones de H₂O₂ o KCl que se incubaron 3 días a 30°C.

En relación al estrés por alta temperatura la mayoría de los mutantes de delección de los componentes del complejo fueron resistentes a 40°C o incluso presentaron mayor tolerancia que una cepa silvestre a excepción de *mot2Δ* y *caf1Δ*. En el caso de *caf1Δ*, esta cepa presentó resistencia a 37°C (Fig. 19).

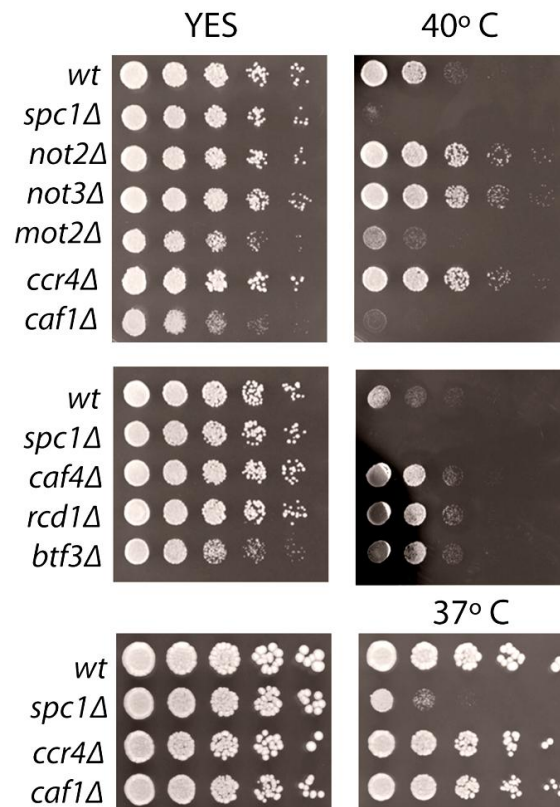


Figura 19. La mayoría de mutantes de delección de los componentes del complejo Ccr4-Not son resistentes a alta temperatura. Las cepas delecionadas en *spc1* o en los componentes del complejo Ccr4-Not fueron cultivadas en medio rico hasta fase exponencial y luego se realizaron diluciones seriadas y ensayo de goteo en placas de medio rico que se incubaron a 30°C, 37°C o 40°C por 2 días.

Interesantemente, la mayoría de los componentes del complejo Ccr4-Not son necesarios para la respuesta a estrés. Además, la mayoría de las proteínas que participan en la interacción de Spc1 con Not1 como Caf1, Ccr4, Ada2, Btf3 y Srb10 son necesarias para la respuesta a estrés, lo que indica que estas interacciones tendrían un papel fisiológico importante en *S. pombe*. En particular, prestamos atención a los componentes Caf1 y Ccr4 dado que la sensibilidad causada por sus delecciones es de un nivel similar al de una cepa *spc1Δ* principalmente en estrés osmótico.

2.2 Ausencia de nitrógeno: diferenciación sexual

La MAPK Spc1, además de mediar la respuesta a estrés oxidativo, osmótico y alta temperatura, es necesaria para responder a deficiencia de nutrientes como ausencia de nitrógeno. La ausencia de nitrógeno promueve la diferenciación sexual o *mating* en *S. pombe*. Por lo tanto estudiamos el papel del complejo Ccr4-Not en este proceso.

Para ello se calculó la eficiencia de *mating* en cepas homotáticas (h^{90}) deficientes en los componentes del complejo y proteínas asociadas, mediante la cuantificación de células, tétradas y cigotos. Una cepa homotática es capaz de realizar *mating* consigo misma dado que el 90% de las células pueden cambiar su tipo sexual aleatoriamente. Por lo tanto, en una colonia hay una mezcla de células h^- y células h^+ que bajo estímulos adecuados (25°C y ausencia de nitrógeno) pueden fusionarse, formar un cigoto y producir una tétrada con cuatro esporas.

Se observó que las delecciones de los componentes *caf1*, *ccr4* o *rcd1* presentaron una marcada reducción en el porcentaje de *mating* respecto a la cepa silvestre. Además, las delecciones de los componentes del grupo “NOT”, *not2*, *not3* o *mot2* también presentaron una disminución moderada del porcentaje de *mating*. Por el contrario, la ausencia de la proteína asociada al complejo Btf3 y del componente de SAGA, Ada2, presentaron un aumento en el porcentaje de *mating* con respecto a la cepa silvestre (Fig. 20).

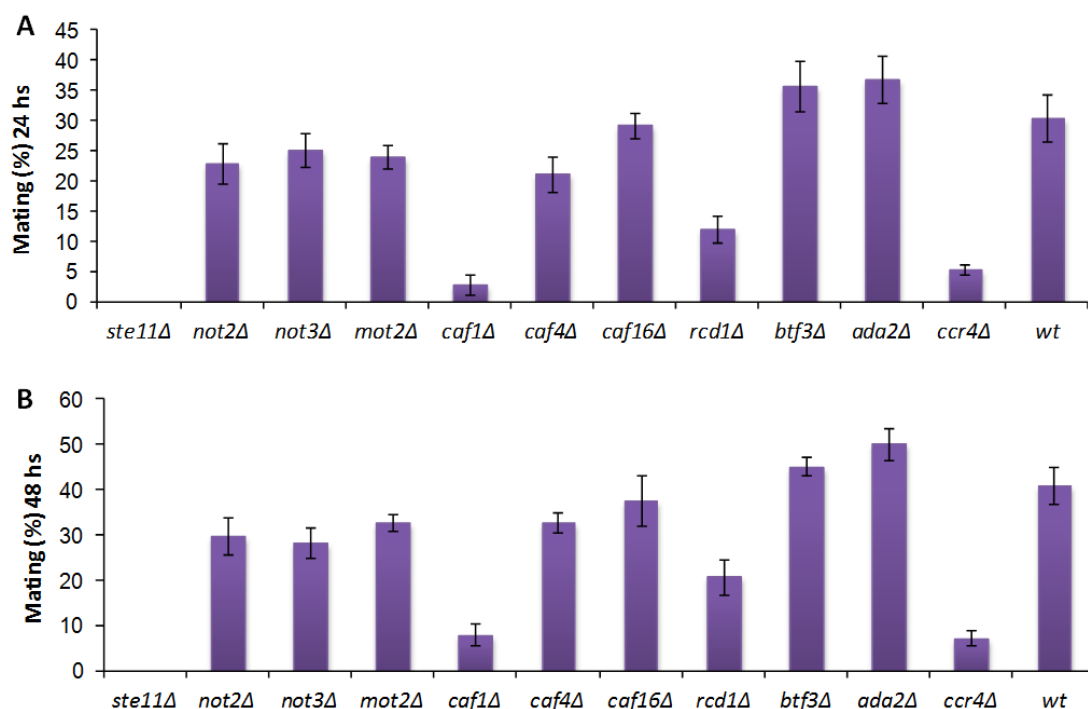


Figura 20. Eficiencia de *mating* de mutantes de los componentes del complejo Ccr4-Not.

Las delecciones indicadas en el fondo h^{90} se incubaron en placas de ME (medio de esporulación) a 25°C por 24 horas (A) o 48 horas (B) y luego se cuantificó la cantidad de tétradas, cigotos y células al microscopio óptico utilizando una cámara de Neubauer y se calculó el porcentaje de *mating* como el % de (cigotos + tétradas) $\times 2 / [(cigotos + tétradas) \times 2 + células]$. Las barras de error representan el error estándar de tres experimentos.

Los resultados obtenidos indican que, al igual que Spc1, todos los componentes del complejo Ccr4-Not y principalmente las proteínas Caf1, Ccr4 y Rcd1 son necesarias para responder a la ausencia de nitrógeno y que se produzca un *mating* correcto.

2.3 Papel del complejo Ccr4-Not en la señalización mediada por Spc1

a) Fosforilación de Spc1

Dado que la principal MAPK de respuesta a estrés en *S. pombe* es Spc1, estudiamos la posible influencia de los componentes del complejo Ccr4-Not en la vía de señalización mediada por Spc1. Para ello estudiamos la fosforilación de la MAPK en condiciones de estrés osmótico. De esta manera se podría atribuir la sensibilidad de las cepas deficientes en los componentes de complejo a eventos que ocurren antes o después de la fosforilación de la MAPK.

Utilizamos cepas deficientes en los distintos componentes del complejo Ccr4-Not y proteínas asociadas que fueron sensibles a estrés y analizamos el nivel de fosforilación de Spc1 en respuesta a estrés en cada uno de ellos.

Los resultados indicaron que los componentes del complejo y proteínas asociadas sensibles a estrés no son necesarios para la fosforilación de Spc1 (Fig. 21).

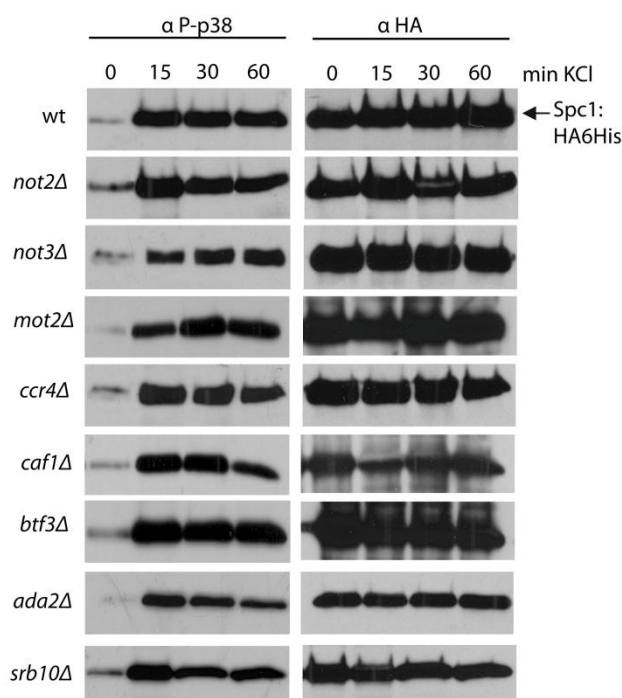


Figura 21. Los mutantes del complejo Ccr4-Not sensibles a estrés no tienen defectos en la fosforilación de Spc1. Cultivos en fase exponencial fueron tratados con KCl 0.6 M por los tiempos indicados y luego se realizó la purificación de Spc1:HA6His con resinas de Níquel y detección de Spc1 fosforilada con el anticuerpo anti P-p38 por WB. Como control de la cantidad de proteína no fosforilada se detectó Spc1:HA6His.

Dado que la fosforilación de Spc1 es indispensable para la respuesta celular a estrés, y que el rol de estas proteínas en la respuesta a estrés no se debe a la regulación de la fosforilación de Spc1, esto indica que deben jugar algún papel posterior en la vía de señalización, por ejemplo, puedan ser sustratos de la MAPK directos o indirectos. Otra posibilidad es que el papel de estos componentes del complejo Ccr4-Not sea independiente de la vía de Spc1.

b) Fosforilación de Atf1

El principal factor de transcripción activado por Spc1 es Atf1. Luego de que la célula detecta el estrés, Spc1 es fosforilada y migra al núcleo donde fosforila a Atf1 que desencadena una respuesta transcripcional global denominada CESR (*Core Environmental Stress Response*). Dado que la fosforilación de Spc1 es normal en los mutantes Ccr4-Not, estudiamos la fosforilación de Atf1 para descartar que la sensibilidad a estrés de los mutantes Ccr4-Not sea porque la activación de Atf1 esté alterada.

Como se puede observar en la Figura 22, los distintos mutantes tratados con estrés osmótico mostraron que la fosforilación de Atf1, que se evidencia con un retraso en la migración de la banda en geles SDS-PAGE, fue normal. Además la abundancia de esta proteína tampoco varió en ausencia de los componentes del complejo.

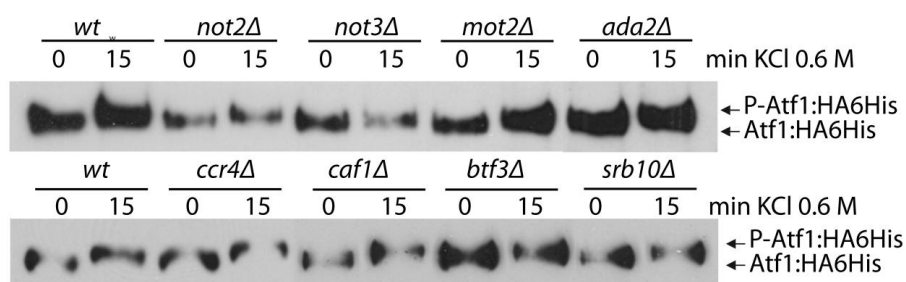


Figura 22. Los mutantes del complejo Ccr4-Not sensibles a estrés no tienen defectos en la fosforilación de Atf1. Se trataron los cultivos en fase exponencial por diferentes tiempos con KCl 0.6 M y luego se realizó la purificación de Atf1:HA6His por Níquel y se detectó el epítipo HA de Atf1:HA6His por WB.

Dado que los componentes del complejo Ccr4-Not no modifican la abundancia o fosforilación de la MAPK Spc1 ni de su principal sustrato Atf1, existe la posibilidad de que el papel del complejo en la respuesta a estrés sea posterior, por ejemplo a nivel de la regulación transcripcional. Por lo tanto realizamos experimentos para contrastar esta hipótesis.

3. PAPEL DEL COMPLEJO CCR4-NOT EN LA REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL DE RESPUESTA A ESTRÉS

3.1 Respuesta transcripcional en estrés oxidativo y osmótico

En *S. cerevisiae* está descrito que varios componentes del complejo Ccr4-Not están implicados en la regulación a nivel transcripcional (Not2 y Not3 son reguladores negativos de la transcripción, Caf1 y Ccr4 son deadenilasas implicadas en degradación de mensajeros, Rcd1 y Mot2 son proteínas de unión a ARN y Ada2 es un componente del complejo co-activador SAGA). Por ello, nos propusimos estudiar si la interacción de estos componentes con Spc1 y la sensibilidad a estrés de sus delecciones, es importante a nivel de la regulación transcripcional de respuesta a estrés.

Para ello utilizamos los genes *gpd1*, *zym1* y *srx1* como reporteros dado que su transcripción es dependiente de Spc1 y realizamos RT-PCR cuantitativa (RT-PCRq) en los mutantes de delección de los componentes del complejo y en el componente de SAGA Ada2. Los experimentos se realizaron agregando a cultivos exponenciales 0.6 M de cloruro de potasio o 1 mM de peróxido de hidrógeno por 15 min

Los resultados indicaron que principalmente en las cepas *ada2Δ*, *ccr4Δ*, *caf1Δ* la inducción de los genes en respuesta a estrés esta disminuida, principalmente evidente en condiciones de estrés osmótico. En estrés oxidativo también se observa esta disminución en los genes *gpd1* y *zym1*. (Fig. 23). Además, también se observó un incremento en la expresión de los genes analizados en los mutantes *not2Δ*, *not3Δ*, *mot2Δ* y *btf3Δ*.

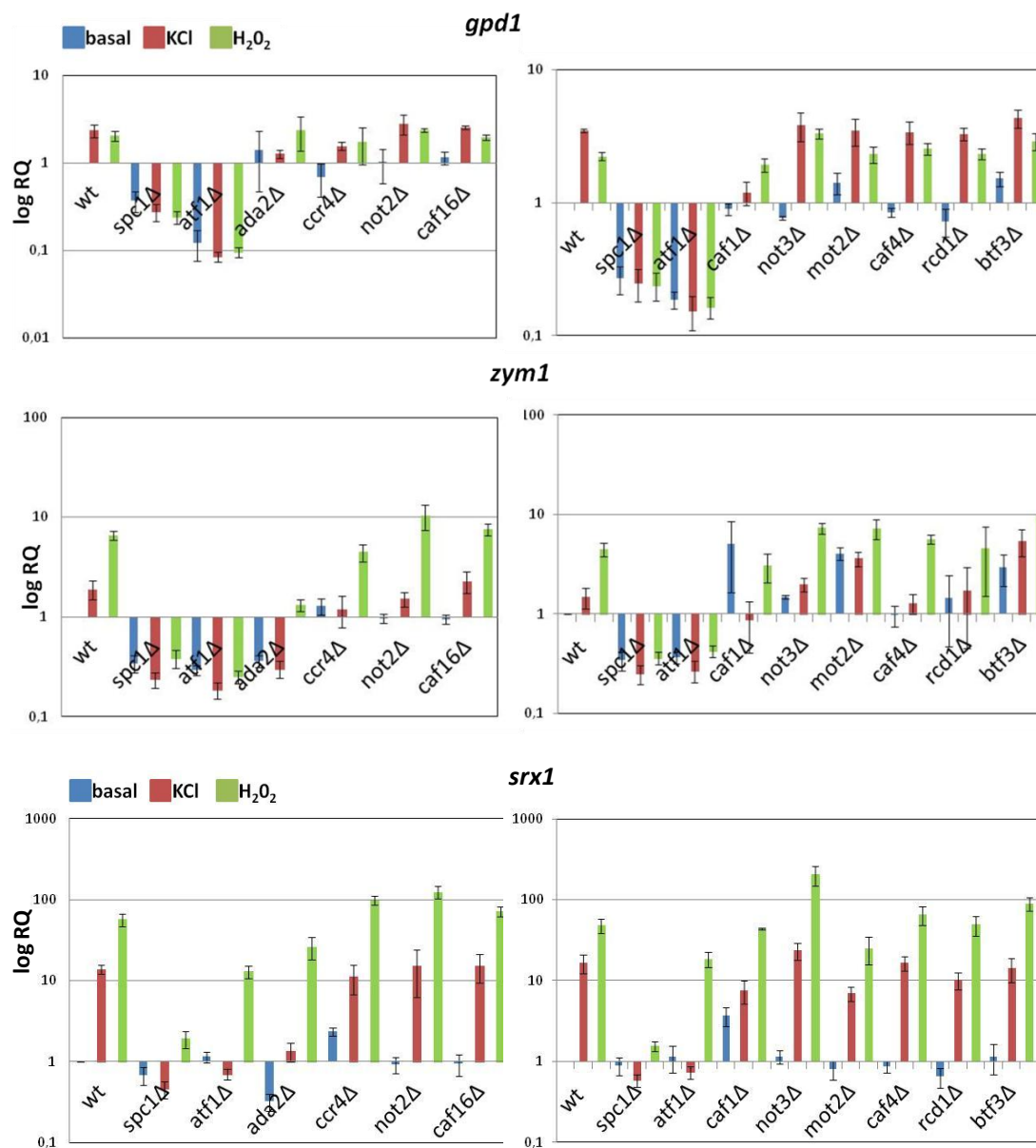


Figura 23. Algunos componentes del complejo sensibles a estrés modifican la inducción de genes inducidos por estrés. Los cultivos en fase exponencial se trataron con 0.6 M de KCl o 1 mM de H_2O_2 por 15 min, se realizó la extracción de ARN y luego PCRq de genes inducidos por estrés, dependientes de la MAPK Spc1 (*gpd1*, *zym1* y *srx1*). Condiciones basales (barras azules), estrés osmótico KCl (barras rojas), oxidativo H_2O_2 (barras verdes). Los resultados se normalizaron a la expresión de actina y con referencia a la muestra silvestre sin tratar. RQ: cuantificación relativa

Por lo tanto, los resultados indican que todos los componentes del complejo Ccr4-Not que presentaron sensibilidad en los ensayos de viabilidad (Not2, Not3, Caf1, Ccr4, Mot2, Btf3) modifican en alguna medida la inducción de genes de respuesta a estrés dependientes de Spc1. Las deleciones de los componentes Caf4, Caf16 y Rcl1 no sensibles a estrés, presentaron niveles de inducción de los genes *gpd1*, *zym1* y *srx1* similares a la cepa silvestre (wt).

Un resultado que nos llamó la atención es que tanto en las deleciones de los componentes Ccr4 como Caf1 se observó una disminución de los mensajeros inducidos por estrés. Pero, dado que Ccr4 y Caf1 tienen función deadenilasa, se esperaría que la regulación de estas proteínas de los genes inducidos por estrés esté a nivel de la degradación de mensajeros. Sin embargo, en lugar de observarse un aumento de los mensajeros inducidos por estrés, se observó una disminución. Esto es sorpresivo, porque implicaría que estas proteínas están activando la síntesis de ARN además de la degradación, ya sea directa o indirectamente.

Por lo tanto, para comprobar estos resultados, estudiamos por Northern Blot la inducción de otros genes dependientes de Spc1 como ser *ctt1* y *hsp9* en la cepa *caf1Δ* y en este ensayo también observamos la disminución en la inducción de genes a 15 min de tratamiento con 1 mM de H₂O₂ (Fig. 24).

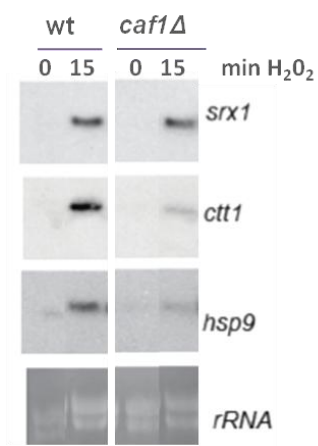


Figura 24. Northern Blot de genes inducidos por estrés en *caf1Δ*. Cultivos en fase exponencial fueron tratados o no por 15 min con H₂O₂ 1 mM y se realizó la extracción de ARN y detección de los transcritos de *srx1*, *ctt1* y *hsp9* por NB. Como control de carga visualizó el ARN ribosómico (rRNA).

De esta manera, concluimos que el complejo Ccr4-Not participa en la respuesta transcripcional de defensa contra el estrés mediada por Spc1 y en particular las deadenilasas Caf1 y Ccr4 parecieran tener un papel en la activación transcripcional de los genes inducidos por estrés estudiados.

3.2 Caf1 modifica la inducción de *Ste11*

Dado que en condiciones de estrés oxidativo y osmótico, hemos observado que tanto Caf1 como Ccr4 modifican la inducción de genes de respuesta a estrés dependientes de Spc1, nos preguntamos si estaría ocurriendo lo mismo en la reproducción sexual con el factor de

transcripción Ste11, el principal factor de transcripción necesario para la reproducción sexual cuya transcripción es dependiente también de Spc1.

Para ello, realizamos un experimento de inducción de la reproducción sexual mediante la privación de nitrógeno del medio de cultivo o la adición de metionina y estudiamos si la ausencia de la deadenilasa Caf1 modifica la inducción del factor de transcripción Ste11, y de Mei2 un transcripto regulado por Ste11.

Se observó que en una cepa delecionada en *caf1*, la inducción de la expresión de *ste11*, principalmente en ausencia de nitrógeno, disminuye con respecto a la cepa silvestre. Lo que es evidenciable también en la expresión de la proteína Ste11 tanto en condiciones de ausencia de nitrógeno como por la adición de metionina. Además, también se observó que disminuye la inducción de *mei2* en condiciones de ausencia de nitrógeno (Fig. 25).

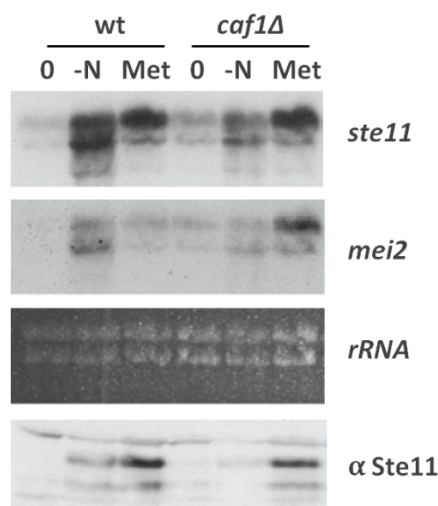


Figura 25. Caf1 regula los niveles de Ste11. Se cultivaron las cepas wt y *caf1Δ* en medio mínimo hasta llegar a fase exponencial y luego se filtraron las células y agregó medio mínimo sin nitrógeno (-N) o medio mínimo con Metionina 200 mg/l (Met) por 4 horas. Se recogieron las células y se realizó la extracción de ARN para detectar *ste11* y *mei2* por NB y la extracción de proteínas por TCA para detectar Ste11 por WB.

Es interesante que en las condiciones nutricionales de señalización de *mating*, ocurra lo mismo que en condiciones de estrés oxidativo y osmótico. Mientras que se esperaría que la deleción de una deadenilasa produjera un aumento en sus transcriptos regulados (por no degradarlos), lo que se observa en respuesta a estrés y en ausencia de nitrógeno es una disminución de la expresión.

4. ASOCIACIÓN DE SPC1 CON LAS DEADENILASAS CCR4 Y CAF1

4.1 Caf1 y Ccr4 copurifican con Spc1

La unión de Spc1 al complejo Ccr4-Not parece estar dada tanto con la proteína *scaffold* Not1, como con otras proteínas como las deadenilasas Ccr4 y Caf1. Dado que estas dos proteínas además tienen un rol importante en la respuesta a estrés, concluido tanto en los ensayos de viabilidad como en la regulación transcripcional de genes activados por estrés, realizamos experimentos de copurificación para comprobar la interacción de Spc1 con Caf1 y Ccr4.

Para ello purificamos Spc1:TAP y detectamos Caf1:HA o Ccr4:HA por WB, como control negativo de purificación realizamos la purificación de TAP en cepas sin Spc1:TAP. Los resultados mostraron que tanto Caf1 como Ccr4 copurifican con Spc1 (Fig. 26).

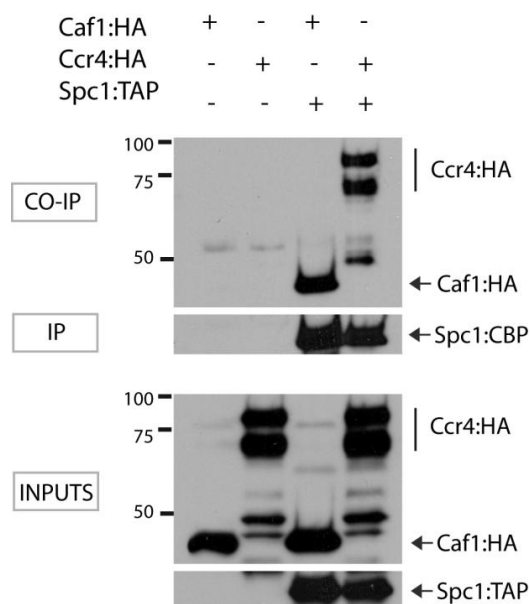


Figura 26. Caf1 y Ccr4 copurifican con Spc1. Se recogieron cultivos en fase exponencial y se realizó la purificación de Spc1:TAP y Western blot anti HA para detectar Caf1:HA y Ccr4:HA. INPUTS: lisados totales.

El experimento de Co-IP demuestra que efectivamente Spc1 interacciona con Caf1 y Ccr4. Esto valida los resultados obtenidos en las copurificaciones de Not1 con Spc1 realizadas en las cepas delecionadas en estos componentes, donde concluimos que Caf1 y Ccr4 están mediando la unión entre estas dos proteínas.

4.2 La interacción de Not1, Caf1 y Ccr4 con Spc1 no está mediada por ARN

El complejo Ccr4-Not participa en todos los procesos del ciclo de vida del ARN, y en particular Caf1 y Ccr4 son proteínas de unión a ARN. Con objeto de estudiar si la unión de estos componentes con Spc1 es proteína-proteína o si está mediada por ARN realizamos los experimentos de copurificación con la adición de ARNasa A.

Como se puede observar en la Figura 27, la copurificación de Not1, Caf1 y Ccr4 con Spc1 se mantuvo tanto en condiciones con ARNasa como sin la adición de la misma.

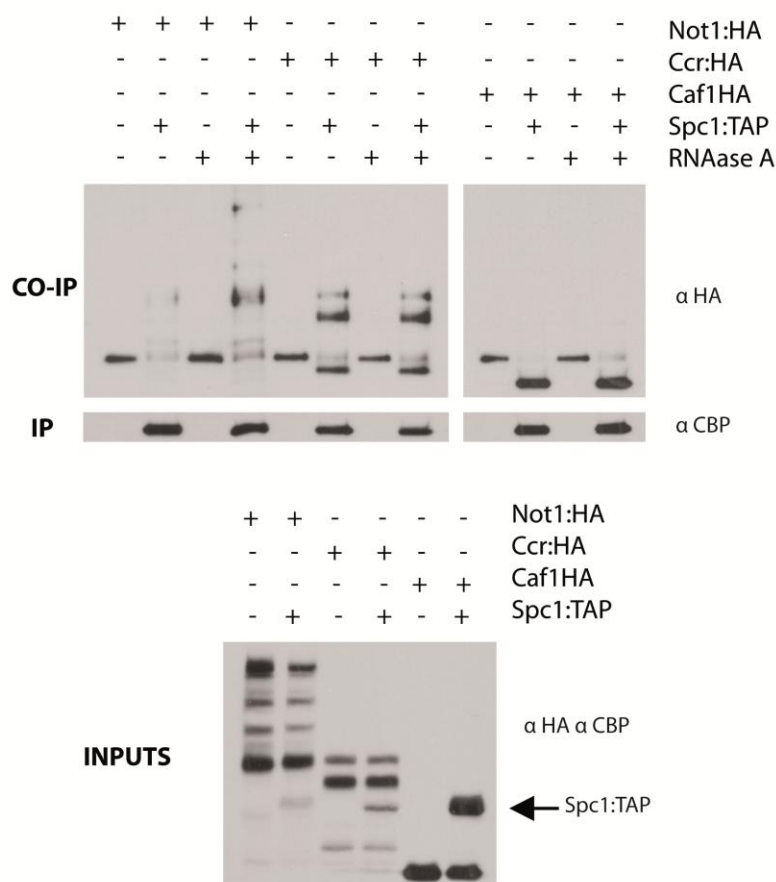


Figura 27. La interacción de Not1, Caf1 y Ccr4 con Spc1 no depende de ARN. Se recogieron cultivos en fase exponencial, se realizaron lisados totales de las diferentes cepas y luego se agregó o no ARNasa A (10 μ g/ml). Seguidamente se realizó la purificación de Spc1:TAP y Western blot anti HA para detectar Not1:HA, Caf1:HA y Ccr4:HA.

Por lo tanto, este experimento nos permite concluir que la interacción de los componentes del complejo Ccr4-Not, Not1, Caf1 y Ccr4 con la MAPK Spc1 no está mediada por ARN y es efectivamente proteína-proteína.

4.3 *Ccr4* y *Caf1* interaccionan genéticamente con *Spc1* en respuesta a estrés

Para estudiar si la MAPK *Spc1* y las deadenilasas *Caf1* y *Ccr4* participan en la respuesta a estrés de manera coordinada, evaluamos si estos genes presentan interacción genética. Los estudios de interacción genética permiten estudiar si la función de un gen depende de otro observando el fenotipo de las deleciones individuales y dobles. Este tipo de ensayos son útiles para caracterizar vías de señalización.

De esta manera, se prepararon los dobles mutantes *ccr4Δ spc1Δ* y *caf1Δ spc1Δ* y se realizaron ensayos de viabilidad en condiciones de estrés oxidativo (H_2O_2), osmótico (KCl) o alta temperatura ($37^\circ C$).

Como en resultados anteriores las cepas delecionadas en *caf1* o *ccr4* presentaron una marcada sensibilidad a estrés. Curiosamente, los dobles mutantes presentaron un crecimiento mayor al de la cepa *spc1Δ* específicamente en condiciones de estrés oxidativo. En otras condiciones de estrés, como osmótico o alta temperatura, la viabilidad de los dobles mutantes fue peor que los mutantes simples (Fig. 28).

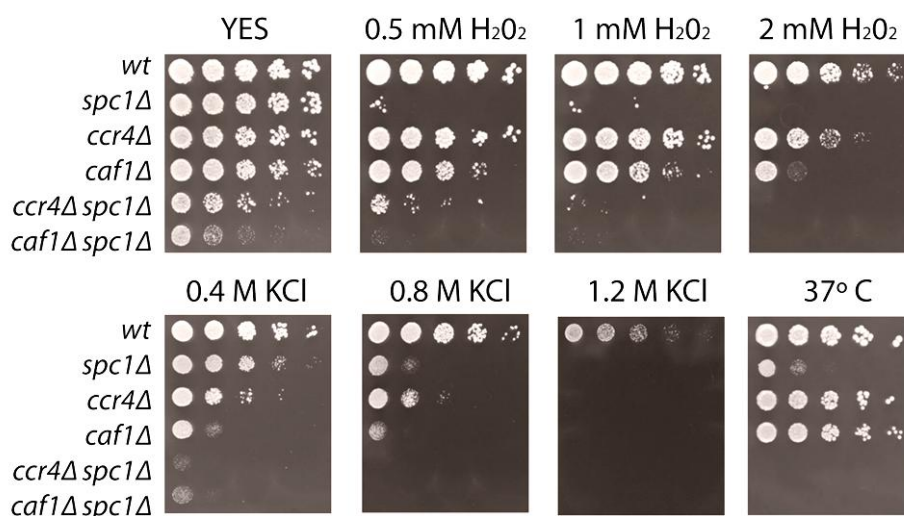


Figura 28. Interacción genética de *spc1* con *ccr4* y *caf1*. Las cepas fueron cultivadas en medio rico hasta fase exponencial y luego se realizaron diluciones seriadas y ensayo de viabilidad en placas de medio rico con o sin H_2O_2 o KCl e incubaron a $30^\circ C$ o $37^\circ C$ durante 2-3 días.

Con respecto a la respuesta por ausencia de nitrógeno, las cepas delecionadas en *caf1* y *ccr4* son imposibles de cruzar con una cepa *spc1Δ*. Además, los dobles mutantes de estos genes con *spc1* generados por transformación, no son capaces de formar cigotos o tétradas.

Por lo tanto, estos resultados indican que en estrés oxidativo hay interacción genética entre *spc1* con *caf1* y *ccr4* con una supresión parcial del fenotipo de *spc1Δ*, mientras que en

estrés osmótico, alta temperatura y ausencia de nitrógeno hay un efecto sumativo de las deleciones en el fenotipo. Esto sugiere una especificidad en la respuesta a estrés oxidativo en comparación a los otros estímulos.

4.4 Caf1 modifica la cinética de inducción de genes en respuesta a estrés oxidativo

Dado que, específicamente, en condiciones de estrés oxidativo hay una supresión parcial del fenotipo de *spc1Δ* en ausencia de Caf1 y Ccr4, nos preguntamos si este efecto se debe a la función de Caf1 y Ccr4 en la regulación transcripcional de respuesta a estrés.

Como el tratamiento de estrés en placa es un estrés crónico, decidimos realizar un ensayo de estrés agudo, realizando el tratamiento con 1mM de H₂O₂ por 15, 30, 45, 60 y 90 min y estudiamos la cinética de inducción de genes dependientes de Spc1 (*srx1*, *ctt1*, *gpd1* y *hsp9*) por Northern Blot en una cepa *caf1Δ* y la comparamos con una silvestre.

La inducción de los genes de respuesta a estrés a los 15 min de tratamiento con 1mM de H₂O₂ fue menor en *caf1Δ* en comparación a la cepa silvestre como habíamos observado previamente (Fig. 24). Sin embargo, en tiempos más largos de tratamiento, a partir de los 30 min, la inducción de los transcritos fue significativamente superior en *caf1Δ* (Fig. 29).

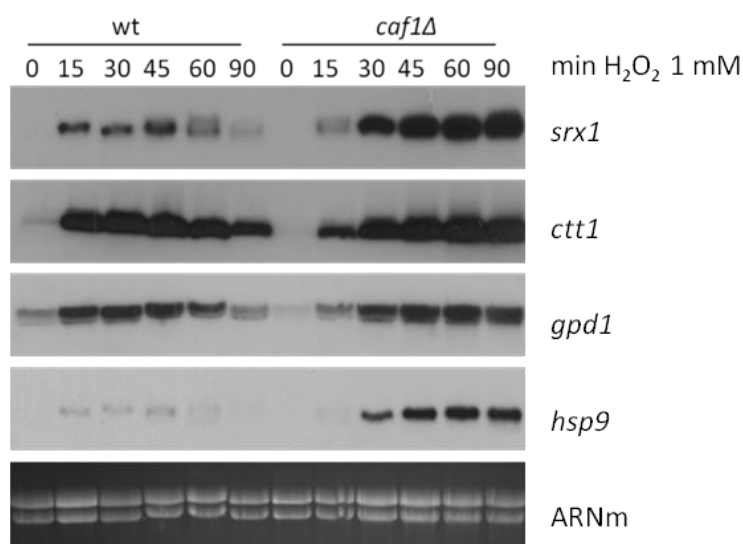


Figura 29. Cinética de inducción de genes regulados por estrés en *caf1Δ*. Cultivos en fase exponencial fueron tratados o no por 15, 30, 45, 60, 90 min con H₂O₂ 1 mM y luego se realizó la extracción de ARN y se detectaron los transcritos de *srx1*, *ctt1*, *gpd1* y *hsp9* por NB. Como control de carga se muestra la tinción con bromuro de etidio del ARN ribosómico (ARNr).

Este cambio de regulación de los transcritos podría ser la explicación a la supresión del fenotipo observado en condiciones de estrés oxidativo. Esperaríamos entonces que en los dobles mutantes *ccr4Δ spc1Δ* y *caf1Δ spc1Δ* haya una supresión del fenotipo de *spc1Δ* con respecto a los defectos de expresión de los genes inducidos por estrés.

Resultados preliminares de RT-PCRq no indican este efecto, pero sin embargo sí se observa que la cinética de inducción de los genes dependientes de estrés en estrés oxidativo y osmótico es diferente en las cepas delecionadas en *ccr4* y *caf1* con respecto a la silvestre. Mientras que estrés oxidativo los niveles de expresión de los genes estudiados son superiores a la cepa silvestre (principalmente a partir de 30 min de tratamiento), en estrés osmótico los niveles de expresión descienden con respecto a la cepa silvestre en todos los tiempos estudiados (Fig. 30).

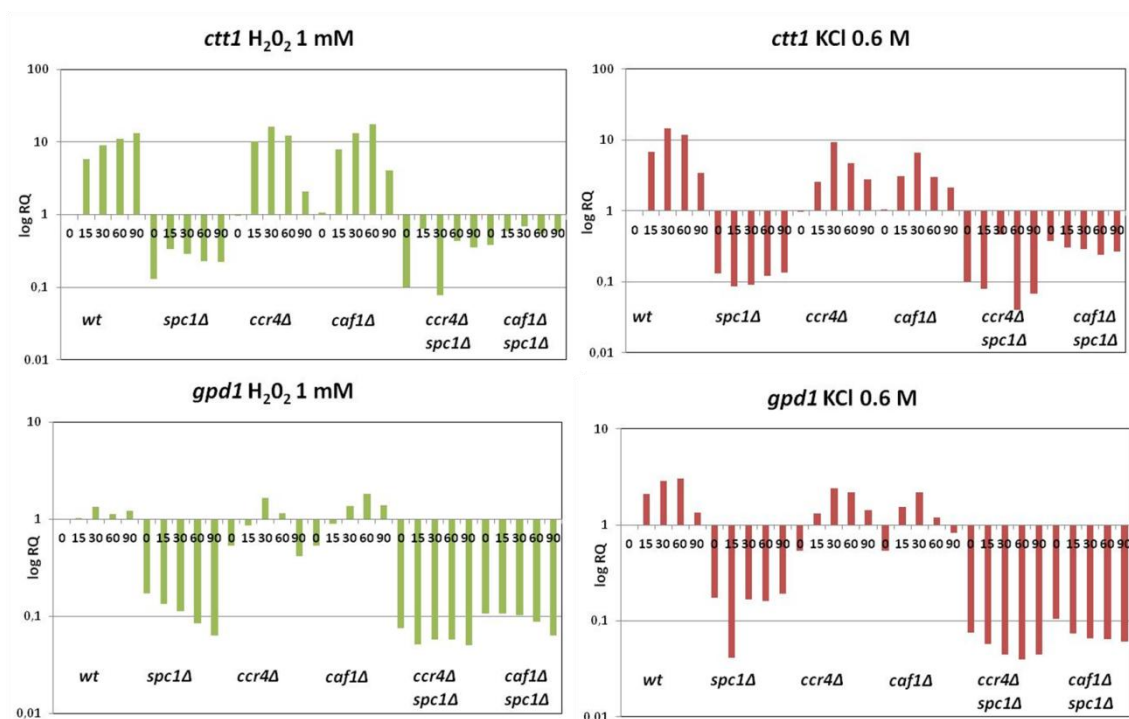


Figura 30. Cinética de inducción de genes regulados por estrés. Cultivos en fase exponencial fueron tratados o no por diferentes tiempos con H_2O_2 1 mM o KCl 0.6 M y luego se realizó la extracción de ARN y se detectaron los transcritos de *ctt1* y *gpd1* por PCRq. Los resultados se normalizaron a la expresión de actina y con referencia a la muestra de la cepa silvestre sin tratar.

Estos resultados indican que la respuesta transcripcional mediada por Caf1 y Ccr4 es distinta en condiciones de estrés oxidativo y de estrés osmótico. Sin embargo, los resultados preliminares de RT-PCRq no indican una supresión evidente del fenotipo en este nivel. Tampoco se observa un efecto sumativo claro de las deleciones en *caf1*, *ccr4* y *spc1* en

condiciones de estrés osmótico, lo que también sería esperado si la interacción genética estuviera en el nivel transcripcional.

4.5 ¿Ccr4 y Caf1 son sustratos de la MAPK Spc1?

Una hipótesis evidente que puede explicar el nexo de unión entre Ccr4, Caf1 y Spc1, es que estas proteínas sean sustratos de la MAPK Spc1. Además, los resultados de interacción genética, sugieren que en condiciones de estrés oxidativo Ccr4 y Caf1 no tienen un papel independiente al de Spc1 e incluso podrían estar en la misma vía de señalización.

a) *Ccr4 y Caf1 no presentan cambios evidentes en su cantidad o movilidad en geles SDS-PAGE después de tratamientos de estrés*

Para evaluar si Caf1 y Ccr4 presentan alguna modificación post-traducciona en respuesta a estrés oxidativo o cambios en su cantidad en presencia o no de Spc1, se trataron los cultivos con 1mM de H₂O₂ por 15, 45 y 60 min y realizamos ensayos de Western Blot.

Se observó que no hay cambios evidentes en la cantidad o movilidad de Caf1:HA o Ccr4:HA en condiciones de estrés y en presencia o ausencia de Spc1 (Fig. 31).

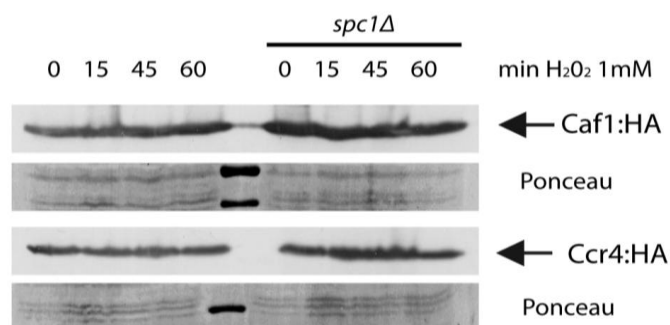


Figura 31. La cantidad o movilidad de Caf1 y Ccr4 en SDS-PAGE no se modifica en condiciones de estrés. Cultivos en fase exponencial fueron tratados o no por diferentes tiempos con H₂O₂ 1 mM y luego se realizó la extracción de proteínas por TCA detección de Caf1:HA y Ccr4:HA por WB. Como control de carga se realizó la tinción de *Ponceau*.

Sin embargo, dado que la fosforilación de proteínas no es siempre evidente en geles SDS-PAGE, decidimos estudiar mediante un ensayo kinasa *in vitro* si Spc1 fosforila o media la fosforilación de Ccr4 o Caf1. Además estudios de fosforilación global en *S. pombe* han

detectado que tanto Ccr4 como Caf1 son fosforiladas en sitios SP/TP (sitios posibles de fosforilación por MAPKs) (Beltrao *et al.* 2009; Wilson-Grady *et al.* 2008).

b) Spc1 no fosforila a Ccr4 ni Caf1 in vitro

Se realizó un ensayo kinasa purificando las proteínas Ccr4:HA, Caf1:HA de cultivos en fase exponencial y Spc1:TAP de un cultivo tratado 15 min con KCl 0.6 M de manera de tener la MAPK fosforilada y activa. Luego se realizó la reacción de fosforilación incubando Ccr4:HA o Caf1:HA purificadas con Spc1:TAP activa y con γ - 32 P-ATP y se observó la purificación de las proteínas por tinción de plata y las proteínas fosforiladas por exposición del gel radiactivo.

En la tinción de plata se observó Spc1:TAP purificada, Caf1:HA y Ccr4:HA no se observaron claramente. Sin embargo, sí se observó una banda de fosforilación específica correspondiente a Caf1:HA. Los resultados indicaron que esta fosforilación no depende de Spc1 dado que se siguió detectando la banda fosforilada en una cepa delecionada en *spc1*. Para Ccr4 no se observaron bandas de fosforilación específicas (Fig. 32).

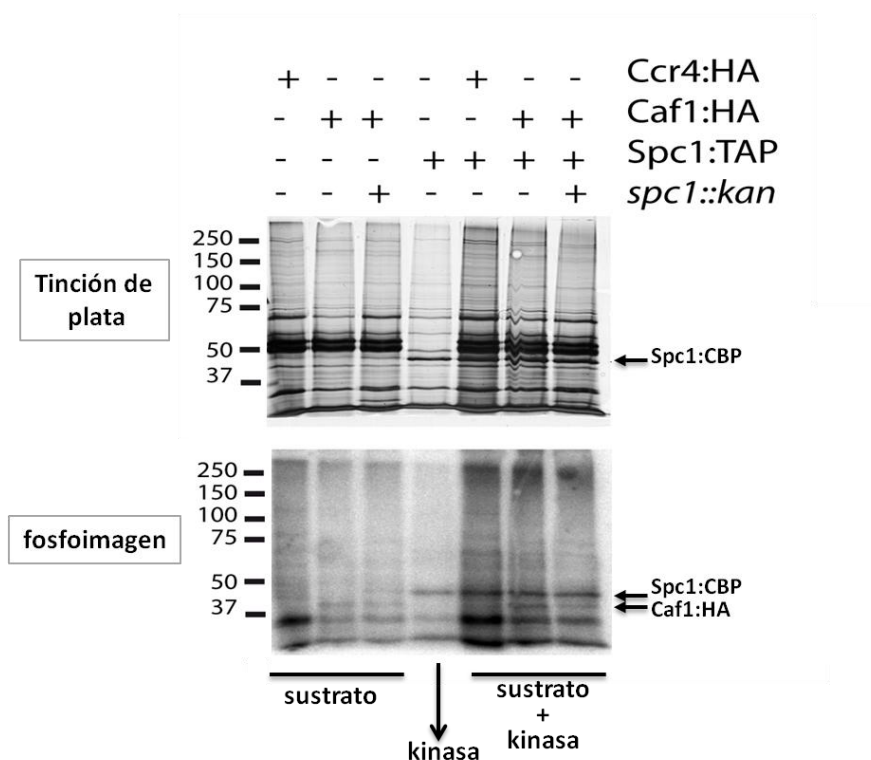


Figura 32. Ensayo kinasa para detectar si Caf1 y Ccr4 son sustratos de Spc1. Se purificaron las proteínas Ccr4:HA, Caf1:HA de cultivos en fase exponencial y Spc1:TAP de un cultivo tratado 15 min con KCl 0.6 M. Luego se incubó Ccr4:HA o Caf1:HA purificadas con Spc1:TAP y γ - 32 P-ATP y se observó la purificación de las proteínas por tinción de plata y las proteínas fosforiladas por exposición del gel radiactivo. *spc1::kan* corresponde a cepas delecionadas en *spc1*.

Por lo tanto, estos resultados sugieren que Caf1 es una fosfoproteína pero que su fosforilación no depende de la presencia de Spc1. Como el ensayo se realizó con purificaciones nativas de los sustratos, posiblemente Caf1 coprecipite con su kinasa.

4.6 La estabilidad de la unión Not1-Caf1-Ccr4 no depende de Spc1

Dado que aparentemente Spc1 no fosforila a Caf1 o Ccr4, otra hipótesis que puede explicar la interacción de Spc1 con Ccr4 y Caf1 es que la presencia de la proteína en sí sea necesaria para la interacción del subcomplejo funcional Ccr4-Caf1-Not1. Para evaluar esto, realizamos ensayos de copurificación de Ccr4:HA y Caf1:HA con Not1:TAP en una cepa silvestre o en una delecionada en *spc1*.

Los resultados indicaron que tanto Ccr4:HA como Caf1:HA copurifican con Not1:TAP, comprobando que en *S. pombe* la estructura del complejo es similar a *S. cerevisiae* y *H. sapiens* donde se han realizado estos ensayos. Por lo tanto, efectivamente la estructura del complejo está conservada en diferentes organismos. Sin embargo esta copurificación no varió en una cepa delecionada en *spc1*, indicando que la presencia de esta proteína es dispensable para la estructura del complejo (Fig. 33).

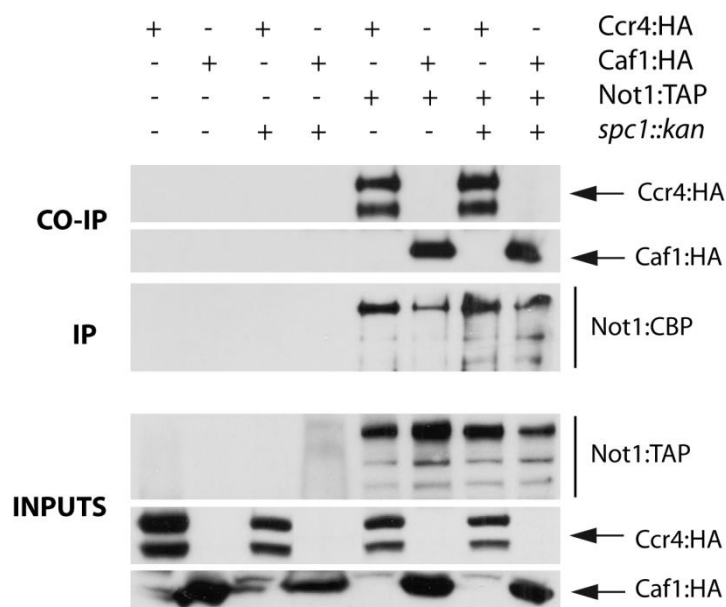


Figura 33. Caf1 y Ccr4 copurifican con Not1 independientemente de la presencia de Spc1. Se recogieron cultivos en fase exponencial y luego se realizó la purificación de Not1:TAP y detección de Caf1:HA y Ccr4:HA por WB en una cepa silvestre o en una delecionada en *spc1* (*spc1::kan*).

5. MECANISMO DEL COMPLEJO CCR4-NOT EN LA RESPUESTA TRANSCRIPCIONAL ANTE EL ESTRÉS

En trabajos realizados en *S. cerevisiae* se ha propuesto que el complejo Ccr4-Not tiene un papel en la regulación transcripcional, tanto por unión directa de los componentes a genes como a la ARN polimerasa II (PolII). Además, también se ha propuesto que el complejo actúa como un factor de elongación. Sin embargo no se conoce cuál es el rol del complejo en la respuesta a estrés. Principalmente porque en *S. cerevisiae* los mecanismos de respuesta a estrés son ligeramente diferentes a los de *S. pombe* o mamíferos (Ver Introducción).

Además, frente al estrés, la MAPK Spc1 junto con el factor de transcripción Atf1, sustrato de la MAPK, se unen a la región promotora de genes inducidos por estrés de manera de activar la transcripción de respuesta a estrés. A su vez, se ha observado que Spc1 también se une a la región codificante de estos genes, aunque no se conoce si participa en la elongación de la transcripción o es un fenómeno indirecto (Reiter *et al.* 2008).

Por los experimentos de RT-PCR cuantitativa y Northern Blots, concluimos que el complejo Ccr4-Not participa en la respuesta transcripcional de defensa contra el estrés. En particular a tiempos cortos de tratamiento con estrés oxidativo (menor a 15 min) Caf1 y Ccr4 parecieran modificar la transcripción en lugar de degradar mensajeros. De esta manera nos planteamos el objetivo de estudiar en mayor profundidad el rol del complejo en la respuesta transcripcional e identificar el/los mecanismo/s por el cual el complejo interviene en esta respuesta.

Para estudiar cual es el mecanismo por el cual el complejo Ccr4-Not y en particular las deadenilasas Caf1 y Ccr4 regulan la respuesta transcripcional de estrés, realizamos ensayos de ChIP (inmunopurificación de cromatina) para estudiar dos posibilidades: si los componentes del complejo se unen directamente a los genes activados en la respuesta a estrés o si modifican la unión de la ARN polimerasa a los genes de respuesta a estrés.

5.1 ¿Se une el complejo Ccr4-Not directamente a genes inducidos por estrés?

Para estudiar si los componentes del complejo Ccr4-Not se unen directamente a genes inducidos por estrés, realizamos ensayos de ChIP. De esta manera realizamos la inmunopurificación de las proteínas Caf1, Ccr4 y Not1 epitopadas con HA y luego detectamos su unión al gen *ctt1* por PCR cuantitativa (PCRq) en condiciones basales o de estrés oxidativo (1 mM H₂O₂ por 5 min).

No observamos unión significativa de Not1 o Caf1 (no mostrado) a los genes inducidos por estrés, sin embargo la subunidad Ccr4 presentó una unión moderada al gen *ctt1* y además la unión aumenta en condiciones de tratamiento con H₂O₂ (Fig. 34).

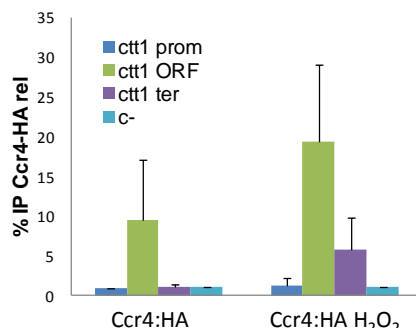


Figura 34. Ccr4 se une al gen *ctt1* en condiciones de estrés oxidativo. Los cultivos tratados o no con 1 mM de H₂O₂ por 5 min se fijaron con 1.5% de formaldehído. Luego se realizó la inmunopurificación de Ccr4-HA y se cuantificó por PCRq la unión de Ccr4:HA a las regiones promotor (prom), ORF y terminador (ter) del gen *ctt1*. El control negativo (c-) representa la cuantificación de la unión de Ccr4:HA a una región intergénica. Las barras de error representan el error estándar de tres experimentos. Se representa el porcentaje de Ccr4:HA inmunopurificada (IP) con respecto a su INPUT y relativo al control negativo (ver Materiales y Métodos).

Estos resultados sugieren que Ccr4 se une al gen *ctt1* a tiempos cortos de tratamiento (5 min) con 1mM de H₂O₂. Esto confirma que esta proteína estaría ejerciendo una regulación a nivel transcripcional de genes inducidos por estrés.

5.2 Caf1 modifica la unión de la ARN polimerasa II a genes de estrés

Dado que los resultados de ChIP de Caf1 indicaron que esta proteína no se une directamente a genes de estrés, realizamos ensayos de ChIP para identificar si Caf1 modifica la unión de PolII a los genes inducidos por estrés, y de esta manera, regula la respuesta transcripcional bajo condiciones de estrés (para Not1 no fue posible realizar estos ensayos porque es una proteína esencial).

De esta manera, estudiamos la unión de las subunidades Rpb3 y Rpb1 de PolII, epitopadas ambas con HA, a genes inducidos por estrés como *ctt1* y *atf1*. Realizamos los experimentos en una cepa *caf1Δ* o en una cepa silvestre y en condiciones basales o de estrés oxidativo (1 mM H₂O₂ por 5 min).

Los resultados mostraron que en condiciones de estrés oxidativo, tanto la unión de Rpb3:HA como Rpb1:HA a los genes *ctt1* y *gpd1* está disminuida en una cepa *caf1Δ* con respecto a la cepa silvestre (Fig. 35 y 36).

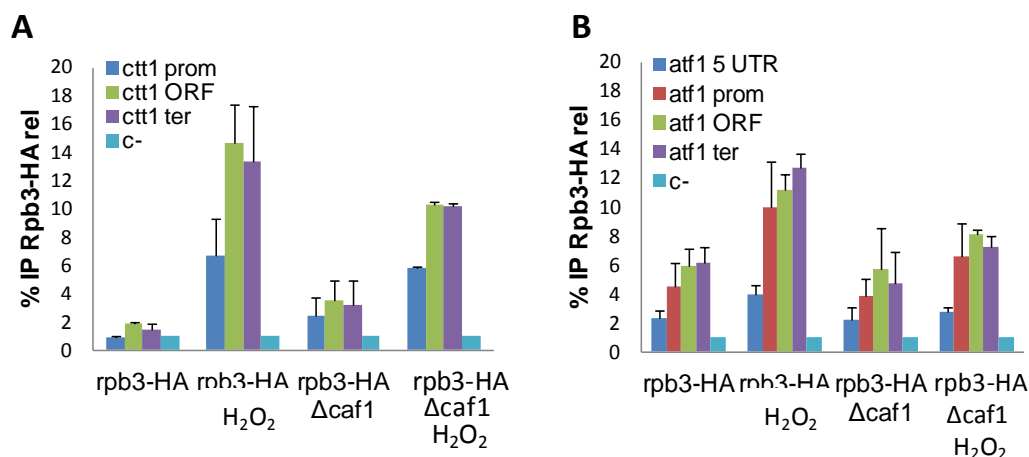


Figura 35. Caf1 es necesaria para la unión de Rpb3-HA a genes de estrés. Los cultivos tratados o no con 1 mM de H₂O₂ por 5 min se fijaron con 1% de formaldehído. Se realizó la inmunopurificación de Rpb3-HA y se cuantificó por PCRq la unión de Rpb3-HA a las regiones promotor (prom), ORF y terminador (ter) del gen *ctt1* (A) y *atf1* (B). El control negativo representa la cuantificación de la unión de Rpb3:HA a una región intergénica. Las barras de error representan el error estándar de tres experimentos. Se representa el porcentaje de Rpb3:HA inmunopurificada (IP) con respecto a su INPUT y relativo al control negativo (ver Materiales y Métodos).

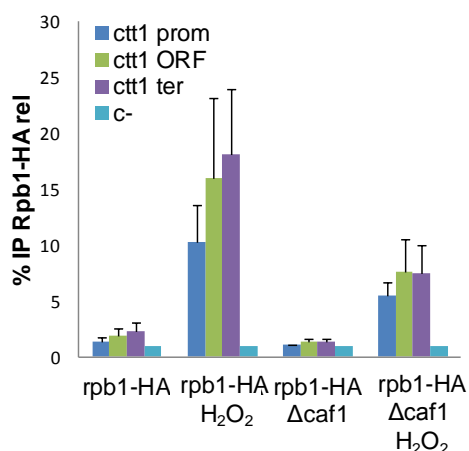


Figura 36. Caf1 es necesaria para la unión de Rpb1-HA a genes de estrés. Los cultivos tratados o no con 1 mM de H₂O₂ por 5 min se fijaron con 1% de formaldehído. Se realizó la inmunopurificación de Rpb1-HA y se cuantificó por PCRq la unión de Rpb1-HA a las regiones promotor (prom), ORF y terminador (ter) del gen *ctt1*. El control negativo representa la cuantificación de la unión de Rpb1 a una región intergénica.

Por lo tanto, estos resultados sugieren que Caf1 es necesaria para que PolIII se una a los genes inducidos por estrés estudiados, en condiciones de estrés oxidativo. En consecuencia, la ausencia de Caf1 disminuye el reclutamiento de la polimerasa a estos genes, lo que podría explicar por qué en los experimentos de RT-PCRq y Northern Blot (Fig. 23 y 24) observamos menor inducción de los genes inducidos por estrés en *caf1Δ* a tiempos cortos de tratamiento.

5.3 Rol de Caf1 en la fase de iniciación de la transcripción

Para continuar con el estudio del rol de Caf1 en la regulación transcripcional de respuesta a estrés, investigamos como están afectadas las fases de regulación de la transcripción en la cepa *caf1Δ*. Para estudiar el rol de la proteína Caf1 en la fase de iniciación de la transcripción, estudiamos la unión de la ARN polimerasa fosforilada en Ser5 (ver Introducción) a genes inducidos por estrés (*ctt1* y *atf1*) en una cepa *caf1Δ* comparado a una silvestre.

Para ello realizamos ensayos de ChIP con anticuerpos anti-serina 5 fosforilada de la región CTD de PolII (Ser5-CTD) en condiciones basales o de estrés oxidativo (1 mM H₂O₂ durante 5 min).

La unión de la polimerasa fosforilada en la serina 5 a los genes *ctt1* y *atf1* no varió en la cepa delecionada en *caf1* (Fig. 37). Por lo tanto, esto sugiere que Caf1 no participa en la iniciación de la transcripción.

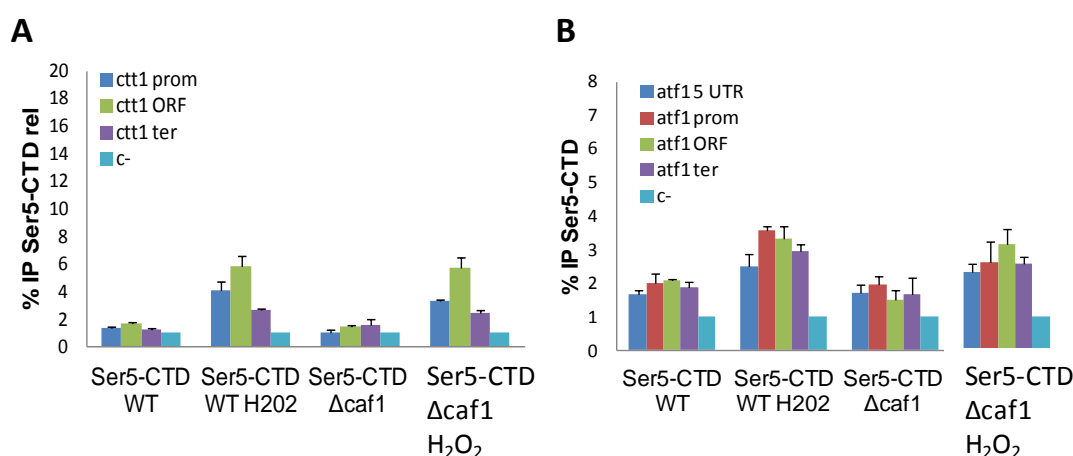


Figura 37. Caf1 no es necesaria para la unión de Ser5-CTD a genes de estrés. Los cultivos tratados o no con 1 mM de H₂O₂ por 5 min se fijaron con 1% de formaldehído. Se realizó la inmunopurificación de Ser5-CTD y se cuantificó por PCRq la unión de Ser5-CTD a las regiones promotor (prom), ORF y terminador (ter) del gen *ctt1* (A) y *atf1* (B). El control negativo representa la cuantificación de la unión de Ser5-CTD a una región intergénica. Las barras de error representan el error estándar de tres experimentos. Se representa el porcentaje de Ser5-CTD inmunopurificada (IP) con respecto a su INPUT y relativo al control negativo (ver Materiales y Métodos).

5.4 Rol de Caf1 y Ccr4 en la fase de elongación de la transcripción

Para asignar un rol en la regulación de la fase de elongación de la transcripción, se ha establecido que una proteína debe cumplir con diferentes requisitos experimentales (Egloff & Murphy 2008; Tansey 2006).

- Presentar sensibilidad a drogas de inhibición de la elongación como el 6-azauracilo (6-AU) y el ácido micofenólico (MPA). El 6-AU es un inhibidor de las enzimas que implicadas en la biosíntesis de purinas y pirimidinas, lo que conduce a alteraciones en los niveles de nucleótidos *in vivo*. Por lo tanto, la depleción de los niveles de nucleótidos por 6-AU puede disminuir la elongación de la transcripción (Exinger & Lacroute 1992). El MPA es un inhibidor de la inosin monofosfato deshidrogenasa lo que afecta la transcripción (Gaillard *et al.* 2009)
- Presentar interacción genética como por ejemplo, letalidad sintética con otras proteínas que tengan roles en la elongación o sean factores de elongación.
- Modificar la unión de PolIII fosforilada en CTD-Ser2.

De esta manera, evaluamos estos requisitos con las proteínas Caf1 y Ccr4.

a) *Ensayo de sensibilidad a drogas de inhibición de la elongación: 6-AU y MPA*

Para estudiar si Caf1 y Ccr4 modifican la inducción de genes mediante la regulación de la fase de elongación de la transcripción, realizamos ensayos de sensibilidad a 6-azauracilo (6-AU) y a ácido micofenólico (MPA) en cepas delecionadas en *ccr4* y *caf1*. Como control utilizamos una cepa delecionada en el factor de elongación *iki3*, un componente del complejo Elongador. Además, dado que se ha sugerido un posible rol en la elongación para Spc1, y continuando con el estudio del papel de la interacción de la MAPK con el complejo Ccr4-Not analizamos la sensibilidad de esta cepa.

Observamos que tanto Caf1, Ccr4, como Spc1 son necesarios para la viabilidad de las células en presencia de estas drogas y además los dobles mutantes con el factor de elongación *iki3* son sintéticos letales incluso en condiciones basales (Fig. 38).

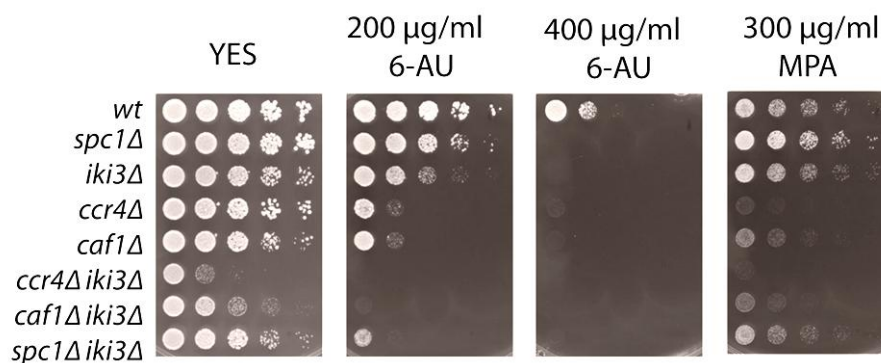


Fig. 38. Sensibilidad de *caf1Δ*, *ccr4Δ* y *spc1Δ* a drogas de inhibición de la elongación. Las cepas indicadas en el panel de la izquierda fueron cultivadas en medio rico hasta alcanzar fase exponencial y luego se realizaron diluciones seriadas y ensayo de viabilidad en placas de medio rico con diferentes concentraciones de 6-AU y MPA e incubaron a 30°C 3 días.

Por lo tanto, tanto Spc1 como Ccr4 y Caf1 presentan además de la sensibilidad a estrés, sensibilidad a drogas de inhibición de la elongación, y son sintéticos letales con la delección de un factor de elongación, lo que indica fenotipos comunes para estas tres proteínas y un posible papel en la elongación de la transcripción.

*b) Interacción genética de *spc1*, *caf1* y *ccr4* en la elongación de la transcripción*

Para estudiar si los genes *spc1*, *caf1* y *ccr4* presentan interacción genética en el proceso de elongación de la transcripción, realizamos nuevos ensayos de viabilidad incluyendo a los dobles mutantes *caf1Δ spc1Δ*, *ccr4Δ spc1Δ* y *ccr4Δ caf1Δ* en presencia de la droga 6-AU.

En estos ensayos se observó que en los dobles mutantes la sensibilidad a 6-azauracilo se incrementó con respecto a los mutantes simples (Fig. 39).

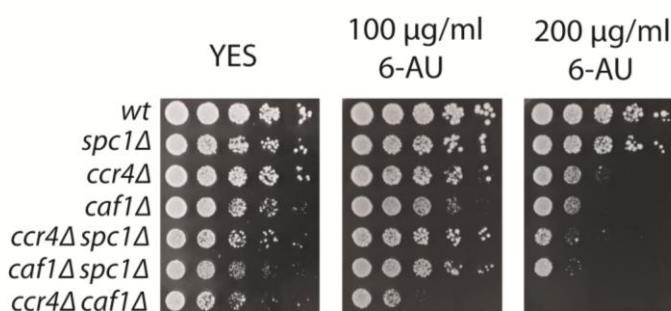


Figura 39. Ensayo de sensibilidad a 6-AU para estudiar la interacción genética entre *spc1*, *caf1* y *ccr4*. Las cepas indicadas en el panel de la izquierda fueron cultivadas en medio rico hasta alcanzar la fase exponencial y luego se realizaron diluciones seriadas y ensayo de viabilidad en placas con diferentes concentraciones de 6-azauracilo (6-AU) e incubaron a 30°C durante 3 días.

Estos resultados indican que hay interacción genética entre los genes estudiados, y dado que el fenotipo se empeora en las dobles delecciones, posiblemente estas proteínas no participen en la misma vía de señalización, pero podrían actuar coordinadamente sobre los mismos sustratos. Es curioso además que la doble delección *ccr4Δ caf1Δ* presente interacción genética dado que ambas proteínas actúan en los mismos procesos. También comprueban que las tres proteínas (Spc1, Caf1 y Ccr4) son necesarias para sobrevivir en presencia de la droga 6-AU, sugiriendo un rol en el proceso de elongación de la transcripción.

c) *Caf1 modifica la unión de PolIII fosforilada en CTD-Ser2 a genes de estrés*

Dado que otro requisito que debe presentar una proteína para ser considerada factor de elongación es modificar el reclutamiento de PolIII fosforilada en Ser2-CTD, realizamos experimentos de ChIP con anticuerpos anti Ser2-CTD en la cepa *caf1Δ* y la silvestre en condiciones basales o de estrés oxidativo.

Se observó que, en condiciones de estrés oxidativo, la unión de PolIII fosforilada en Ser2-CTD aumenta en la cepa *caf1Δ* con respecto a la cepa silvestre. Para comprobar el resultado realizamos el experimento tanto en la cepa con Rpb3:HA (previamente utilizada para cuantificar la unión de PolIII total a genes de estrés) como en una cepa sin epitopar, obteniendo el mismo aumento en el reclutamiento de Ser2-CTD (Fig. 40).

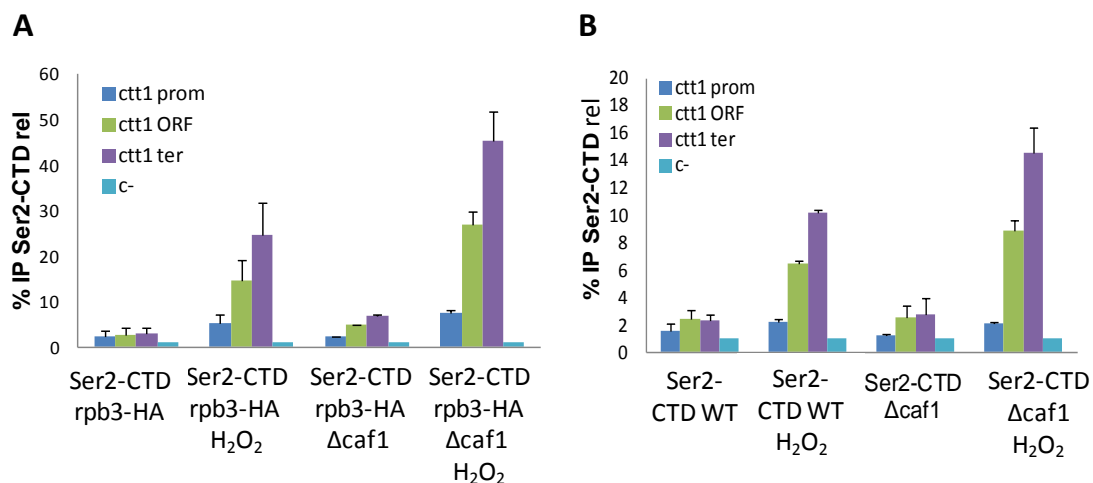


Figura 40. Caf1 es necesaria para la unión de Ser2-CTD a genes de estrés. Los cultivos tratados o no con 1 mM de H₂O₂ por 5 min se fijaron con 1% de formaldehído. Se realizó la inmunopurificación de Ser2-CTD en una cepa con rpb3:HA (A) o una cepa no epitopada (B) y se cuantificó por PCRq la unión de Ser2-CTD a las regiones promotor (prom), ORF y terminador (ter) del gen *ctt1*. El control negativo representa la cuantificación de la unión de Ser2-CTD a una región intergénica. Las barras de error representan el error estándar de tres experimentos. Se representa el porcentaje de Ser2-CTD inmunopurificada (IP) con respecto a su INPUT y relativo al control negativo (ver Materiales y Métodos).

Los resultados indican que el reclutamiento de Ser2-CTD está comprometido en una cepa delecionada en *caf1* en respuesta a estrés oxidativo. Esto sugiere que Caf1 es necesaria para realizar una correcta elongación de la transcripción en condiciones de estrés.

Como conclusión de los resultados presentados hasta aquí, las proteínas Caf1 y Ccr4 participan en la respuesta a estrés modificando la inducción de genes de respuesta a estrés y el mecanismo pareciera estar dado por una menor unión de PolIII a estos genes y a un defecto en la fase de elongación de la transcripción.

5.5 Caf1 interacciona genéticamente con Gcn5

En la sección anterior concluimos que la interacción de la MAPK Spc1 con Not1 es facilitada por otros componentes del complejo Ccr4-Not como Caf1, Ccr4 y también Btf3 y Ada2.

La proteína Ada2 pertenece al complejo SAGA (Spt–Ada–Gcn5 acetiltransferasa). Este complejo desempeña un papel co-activador de la transcripción y participa en la regulación de la respuesta a estrés oxidativo (Sanso *et al.* 2011b) y *mating* (Helmlinger *et al.* 2008) en *S. pombe* (ver Introducción).

Gcn5 es una acetiltransferasa de histonas H3 que también pertenece al complejo SAGA. En condiciones de estrés oxidativo, Gcn5 es reclutada a promotores y regiones codificantes de genes inducidos por estrés de una manera dependiente de Spc1. El mecanismo por el cual Gcn5 participa en la respuesta transcripcional de estrés es permitiendo la elongación de PolII mediante el desalojo de los nucleosomas localizados corriente abajo de los promotores de los genes inducidos por estrés (Sanso *et al.* 2011b).

Gcn5 desempeña un papel importante en la respuesta a estrés oxidativo mediada por Spc1. Dado nuestro interés en estudiar cómo el complejo Ccr4-Not, y en particular los componentes Caf1 y Ccr4 participan en la respuesta a estrés, estudiamos como interaccionan genéticamente Caf1 con Gcn5. Además, el mecanismo por el cual Gcn5 media la respuesta a estrés pareciera ser similar al de Caf1, en el sentido de que ambas proteínas estarían regulando la fase de elongación de la transcripción de genes inducidos por estrés.

a) *Sensibilidad a estrés: La vía de Caf1 de respuesta a estrés es independiente de la de Gcn5*

Para determinar si Caf1 presenta interacción genética con Gcn5, realizamos ensayos de viabilidad frente a estrés oxidativo (H₂O₂) u osmótico (KCl) y observamos la sensibilidad de cepas deficientes en cada una de estas proteínas y en el doble mutante *caf1Δ gcn5Δ*.

En los ensayos de viabilidad, se observó que tanto *gcn5Δ* como *caf1Δ* presentan sensibilidad a estrés oxidativo, mientras que en estrés osmótico sólo *caf1Δ* fue sensible. El doble mutante *caf1Δ gcn5Δ* presentó mayor sensibilidad en estrés oxidativo que los mutantes simples, lo que no se observó en estrés osmótico (Fig. 41).

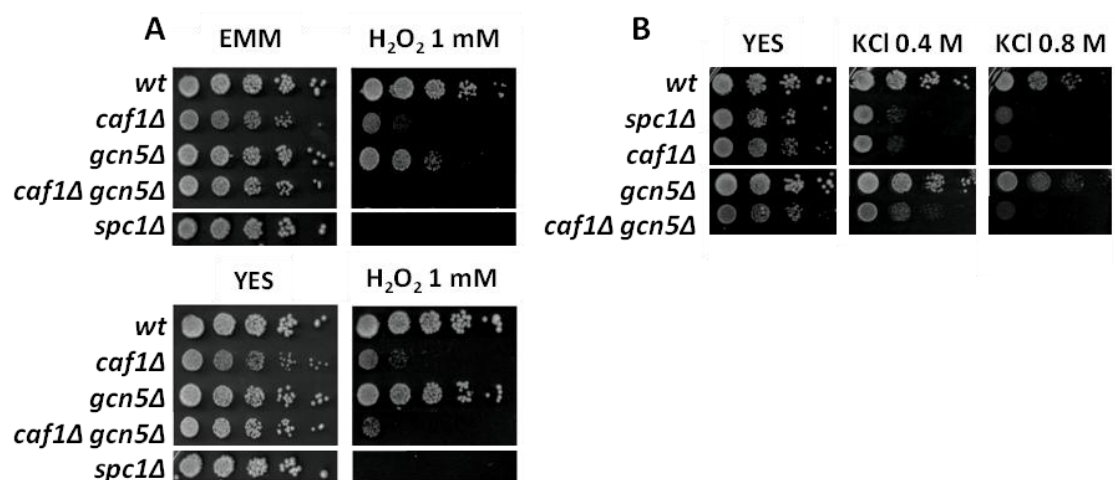


Figura 41. Caf1 interacciona genéticamente con Gcn5. Las cepas indicadas fueron cultivadas en medio mínimo (EMM) o medio rico (YES) hasta alcanzar la fase exponencial y luego se realizaron diluciones seriadas y ensayo de viabilidad en placas de medio mínimo o medio rico con diferentes concentraciones de H₂O₂ (A) o KCl (B) y se incubaron a 30°C por 3 días.

Los ensayos indicaron que, como ha sido descrito, Gcn5 sólo es necesaria para la respuesta a estrés oxidativo, mientras que Caf1 es necesaria para la respuesta a ambos tipos de estrés (este trabajo). En estrés oxidativo, la vía de Caf1 pareciera no ser dependiente de la vía de Gcn5 dado que la delección conjunta de *caf1Δ* con *gcn5Δ* empeora el fenotipo de *caf1Δ*.

b) La regulación de la respuesta transcripcional de estrés por Caf1 es independiente de la vía de Gcn5

- Expresión de genes inducidos por estrés

A la vista de los resultados anteriores, para comprobar si el mecanismo de acción de Caf1 es similar al de Gcn5 comparamos la expresión de genes inducidos por estrés en las distintas cepas.

Al igual que en los ensayos de viabilidad, la doble delección de *gcn5* y *caf1* disminuye la expresión de genes inducidos por estrés (Fig. 42).

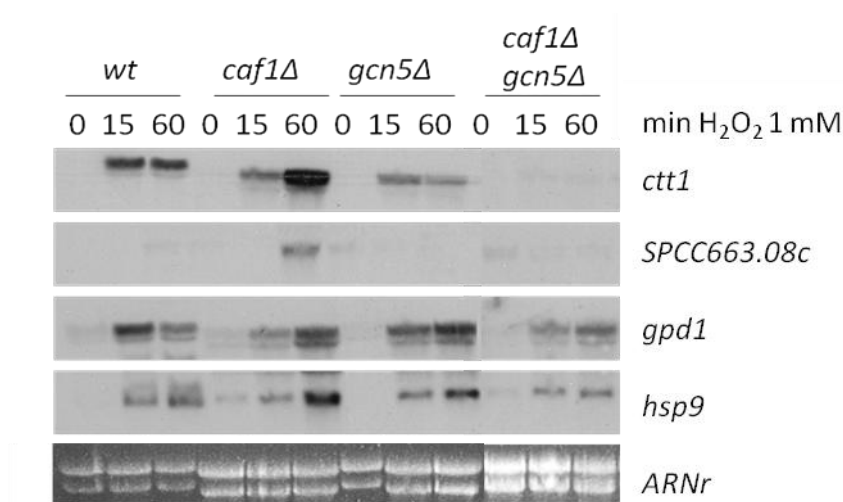


Figura. 42. Gcn5 empeora la respuesta transcripcional de Caf1 en estrés oxidativo. Se realizó el tratamiento de los cultivos con 1 mM de H₂O₂ por 15 o 60 min, se extrajo el ARN y luego se observó por Northern Blot la inducción de los genes de respuesta a estrés *ctt1*, *SPCC663.08c*, *gpd1* y *hsp9* en las cepas indicadas. Como control de carga se visualizó el ARN ribosómico (ARNr).

Por lo tanto, estos resultados sugieren que la interacción genética entre Caf1 y Gcn5 se encuentra a nivel de la regulación transcripcional de los genes de respuesta a estrés. Esto valida los resultados obtenidos hasta el momento con respecto al papel de Caf1 en la regulación transcripcional de respuesta a estrés e indica que esta proteína y probablemente el complejo Ccr4-Not participan de forma colaborativa a otros complejos como SAGA.

- Reclutamiento de PolII a genes inducidos por estrés

Uno de los mecanismos por los cuales Gcn5 regula la expresión de genes inducidos por estrés es, al igual que lo obtenido para Caf1, mediante la disminución de la unión de PolII a estos genes (Sanzo *et al.* 2011b). Para estudiar si los resultados de expresión obtenidos en el experimento anterior (Fig. 30) son consecuencia de la unión deficiente de PolII, realizamos un experimento de ChIP inmunopurificando PolII en una cepa *gcn5Δ* o en el doble mutante *gcn5Δ caf1Δ* en condiciones basales o de estrés oxidativo.

En los resultados preliminares presentados (una sola réplica), se observó que la unión de PolII al gen *ctt1* disminuye en la cepa *gcn5Δ*, y en el doble mutante *gcn5Δ caf1Δ* se observa una disminución aun mayor (Fig. 43).

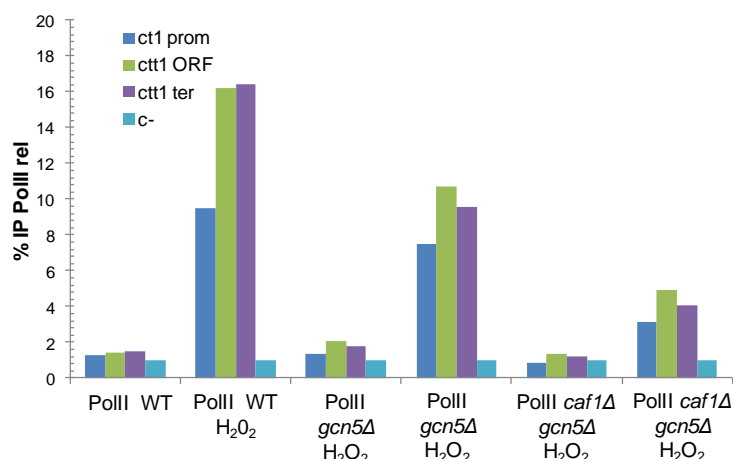


Figura 43. La unión de PolII disminuye en *caf1Δ gcn5Δ*. Los cultivos tratados o no con 1 mM de H₂O₂ por 5 min se fijaron con 1% de formaldehído. Se realizó la inmunopurificación de PolII y se cuantificó por PCRq la unión de Ser2-CTD a las regiones promotor (prom), ORF y terminador (ter) del gen *ctt1*. El control negativo representa la cuantificación de la unión de PolII a una región intergénica. Las barras de error representan el error estándar de tres experimentos. Se representa el porcentaje de PolII inmunopurificada (IP) con respecto a su INPUT y relativo al control negativo (ver Materiales y Métodos).

Por lo tanto, esto indicaría que la interacción genética observada tanto en la sensibilidad a estrés como en la expresión de genes inducidos por estrés, es consecuencia del mecanismo similar que tienen tanto Gcn5 como Caf1 de regular la transcripción de respuesta a estrés.

6. PAPEL DEL COMPLEJO CCR4-NOT EN LA REGULACIÓN POST-TRADUCCIONAL DE SPC1

El complejo Ccr4-Not, además de ser un regulador global de la expresión génica, participa en muchas funciones celulares y se le han atribuido otras funciones como la modificación post-traducciona de proteínas (ver Introducción). Entre los resultados mostrados en esta memoria, observamos que la mayoría de los componentes del complejo son necesarios para responder a estrés. Sin embargo, dichos componentes (Not2, Not3, Mot2, Caf1, Ccr4 y Btf3) no participan en la fosforilación activadora de Spc1, la principal modificación post-transcripcional descrita para Spc1.

En particular, el componente Mot2 es especialmente interesante por sus características bioquímicas; además de ser una proteína de unión a ARN presenta un sitio RING típico de las ubiquitin ligasas E3. Dado que Mot2 es necesaria para la respuesta a estrés, tiene una función demostrada en la ubiquitinación de proteínas (ver Introducción), y pertenece al complejo Ccr4-Not que interacciona con Spc1, estudiamos si Spc1 está modificada post-traducciona.

7. BÚSQUEDA DE MODIFICACIONES POST-TRADUCCIONALES EN SPC1

El interrogante principal de la vía de respuesta a estrés es cómo se consigue una respuesta específica a cada tipo de estímulo. Una hipótesis para esta respuesta específica, es que Spc1 sea modificada post-traduccionalmente y que esta modificación sea necesaria para distinguir entre los diferentes tipos de estrés.

7.1 La proteína Spc1 presenta bandas de mayor peso molecular en ensayos de electroforesis

Una pista que indica que una proteína puede tener modificaciones post-traduccionales es detectar en un gel desnaturalizante bandas de mayor peso molecular que la proteína en cuestión. De esta manera, cuando realizamos los ensayos de purificación por TAP de Spc1, se detectó una banda de mayor peso molecular correspondiente a Spc1 de ~110 kDa. Además, también observamos por Western Blot que Spc1 fosforilada se presenta en bandas de menor movilidad electroforética (Fig. 44).

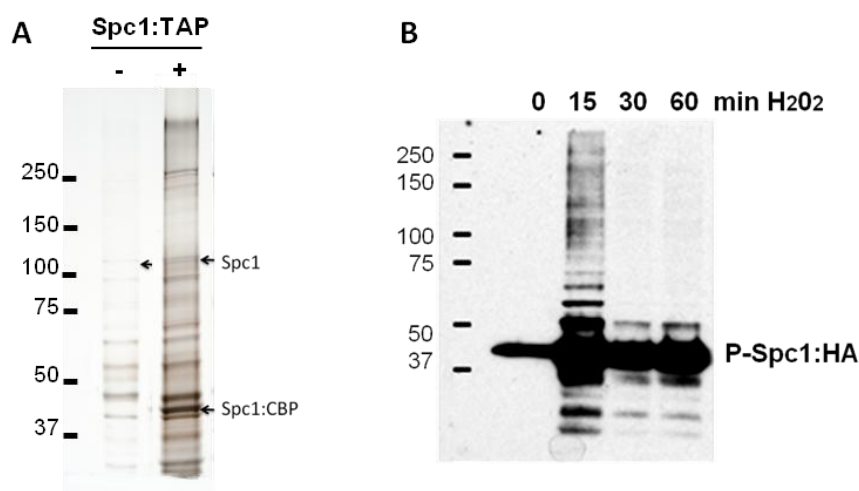


Figura 44. Detección de bandas de mayor peso molecular de Spc1. A. Se recogieron 500 ml de cultivo en fase exponencial en medio rico y luego se realizó la purificación de Spc1-TAP. Como control negativo se realizó también la purificación en una cepa silvestre. Los eluidos se resolvieron en SDS-PAGE y luego se realizó la tinción de plata y detección por espectrometría de masas de las bandas específicas copurificadas con Spc1:TAP. B. Cultivos en fase exponencial fueron tratados con 1 mM de H₂O₂ durante 15, 30 y 60 min y luego se realizó la purificación de Spc1:HA6His y posterior detección de Spc1 fosforilada por Western Blot utilizando un anticuerpo anti-fosfop38.

Dado que Spc1 se presenta en diferentes pesos moleculares, una posibilidad es que la proteína tenga una modificación repetitiva como es la poli-ubiquitinación. La ubiquitina tiene

un tamaño de 8,5 kDa y por lo tanto si Spc1 estuviese poliubiquitinada, cabría esperar que el aumento de tamaño mostrado por las bandas de Spc1 fuesen múltiplos de este tamaño. Por ello, calculamos el tamaño de las bandas observadas en el ensayo de fosforilación de Spc1 (Fig.44 y Tabla8).

banda	PM (kDa)
1	129
2	113
3	94
4	85
5	77
6	69
7	62
8	56
9	50
sin modificar	42

Tabla. 8. Peso molecular de las bandas de mayor peso molecular de Spc1. Se realizó una recta con la distancia de los marcadores de peso molecular con respecto a un punto y luego se calculó el peso molecular de las diferentes bandas extrapolando en la recta.

Como se observa en la Tabla 8, los tamaños de las bandas reconocidas por el anticuerpo anti-fosfo-p38, aumentaron de manera aproximadamente igual a lo esperado para una poliubiquitinación y por lo tanto, estos datos sugieren que Spc1 podría estar ubiquitinada.

7.2 Spc1 está modificada por ubiquitinación en condiciones basales y de estrés

Para demostrar que Spc1 está modificada por ubiquitinación realizamos un ensayo de copurificación con Ubiquitina fusionada a Histidinas según lo descrito por (Takeda & Yanagida 2005).

Para ello, utilizamos los plásmidos pREP1-Ubiquitina:HA (pREP1-Ub:HA) y pREP1-Ubiquitina:His (pREP1-Ub:His) que se transformaron en una cepa Spc1:Myc o una cepa silvestre y realizamos la purificación de la cola de polihistidinas mediante afinidad a Níquel, seguida de la detección de Spc1:Myc por Western Blot. Realizamos este ensayo tanto en condiciones basales como de estrés osmótico (tratamiento con 0.6 M KCl durante 15 min).

Se observó la purificación de bandas de mayor peso molecular correspondientes a Spc1 con las Ubiquitinas fusionadas a histidinas (Ub:His) específicamente y que esta modificación se mantiene también en estrés osmótico (Fig. 45). En todas las purificaciones observamos una

banda correspondiente a Spc1, copurificada tanto con Ub:HA como Ub:His, lo que implica que una pequeña parte de la proteína Spc1 interacciona inespecíficamente con la resina de Níquel.

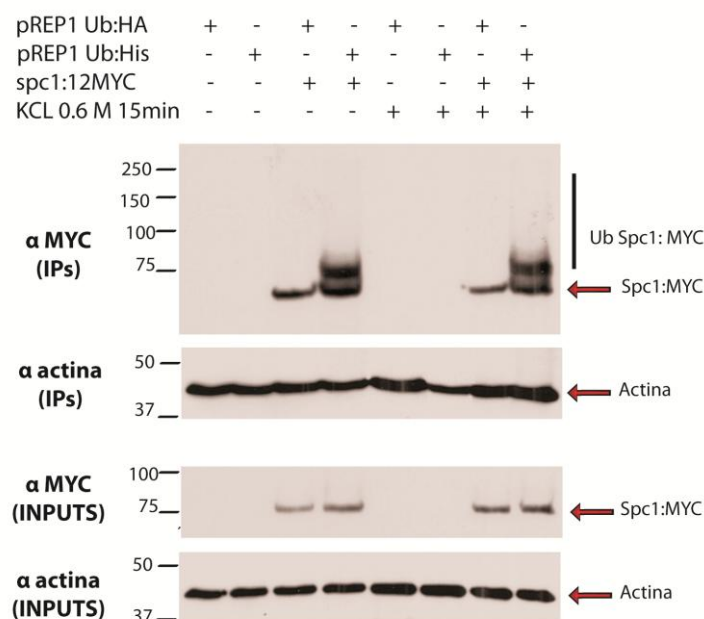


Figura 45. Spc1 copurifica con Ub:His. Los cultivos en fase exponencial fueron tratados o no con KCl 0.6 M durante 15 min y luego se realizó un experimento de copurificación purificando Ubiquitina:His codificada en el plásmido pREP1-Ub:His con resinas de Níquel y detectando Spc1:MYC por WB. Como control negativo se purificó Ubiquitina:HA expresada en el plásmido pREP1-Ub:HA. Como control de carga se detectó Actina en todas las muestras. IPs: Purificaciones con Níquel. INPUTS: lisados totales. Ub Spc1: Spc1 ubiquitinada.

Con este experimento, se puede concluir que Spc1 estaría siendo ubiquitinada tanto en condiciones basales como de estrés y que esta modificación ocurre tanto en la proteína fosforilada como no fosforilada.

7.3 Las subunidades Mts2 y Mts3 del proteasoma no regulan la cantidad de Spc1 ubiquitinada

La ubiquitinación de una proteína puede regular tanto su degradación como ser una modificación reguladora de su actividad.

Para evaluar si la ubiquitinación de Spc1 es necesaria para su degradación por el proteasoma, realizamos el experimento de copurificación de Spc1 con Ubiquitina:His en las cepas mutantes termosensibles de las subunidades del proteasoma *mts2* y *mts3*. Para estudiar el efecto de la ausencia de estas subunidades los cultivos se mantuvieron a 25°C hasta fase exponencial y luego se incubaron a 36°C durante 4 horas.

Como se puede observar en la Figura 46, la ubiquitinación y cantidad de Spc1 no presentó cambios evidentes en ausencia de actividad de Mts2 o Mts3.

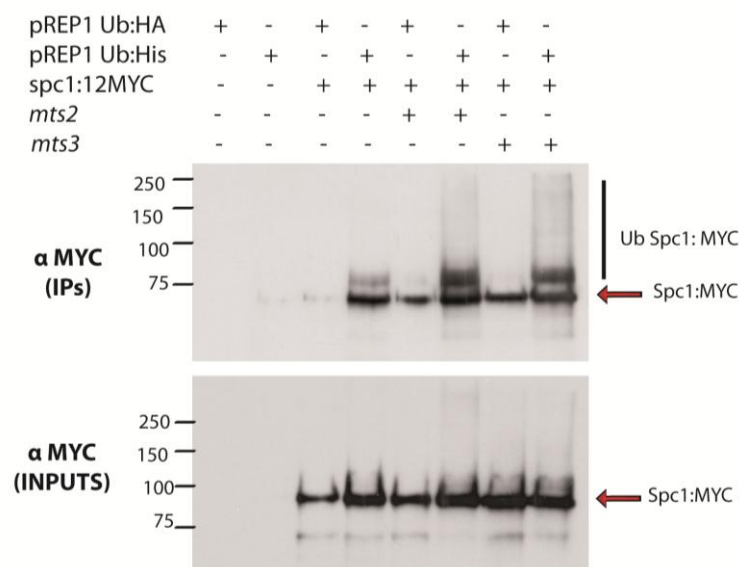


Figura 46. Mts2 y Mts3 no modifican la cantidad de Spc1 ubiquitinada. Cultivos en fase exponencial crecidos a 25°C fueron incubados a 36°C por 4 horas y luego se realizó un experimento de copurificación purificando Ubiquitina:His codificada en el plásmido pREP1-Ub:His con resinas de Níquel y detectando Spc1:MYC por WB. Como control negativo se purificó Ubiquitina:HA expresada en el plásmido pREP1-Ub:HA. IPs: Purificaciones con Níquel. INPUTS: lisados totales. Ub Spc1: Spc1 ubiquitinada.

Por lo tanto, los resultados sugieren que las subunidades Mts2 y Mts3 del proteasoma no estarían regulando la degradación de Spc1.

7.4 Búsqueda de la ubiquitin ligasa E3 de Spc1

Dado que Spc1 está modificada por ubiquitinación, debe existir una ubiquitin ligasa capaz de transferir ubiquitinas a Spc1. Entre las ubiquitin ligasas E3 presentes en el genoma de *S. pombe*, elegimos como candidatas más probables a la proteína Fbh1 que ubiquitina al sustrato de Spc1 Atf1, y a Mot2, la ubiquitin ligasa componente del complejo Ccr4-Not.

Por lo tanto realizamos el experimento de copurificación de Spc1 y Ub:His en cepas delecionadas en *fbh1* o *mot2* en condiciones de estrés osmótico (0.6 M de KCl 15 min) u oxidativo (1 mM de H₂O₂ 15 min).

La ubiquitinación de Spc1 no se modificó en ninguna de las cepas delecionadas (*fbh1Δ* y *mot2Δ*) y en ninguna condición de estrés (Fig. 47).

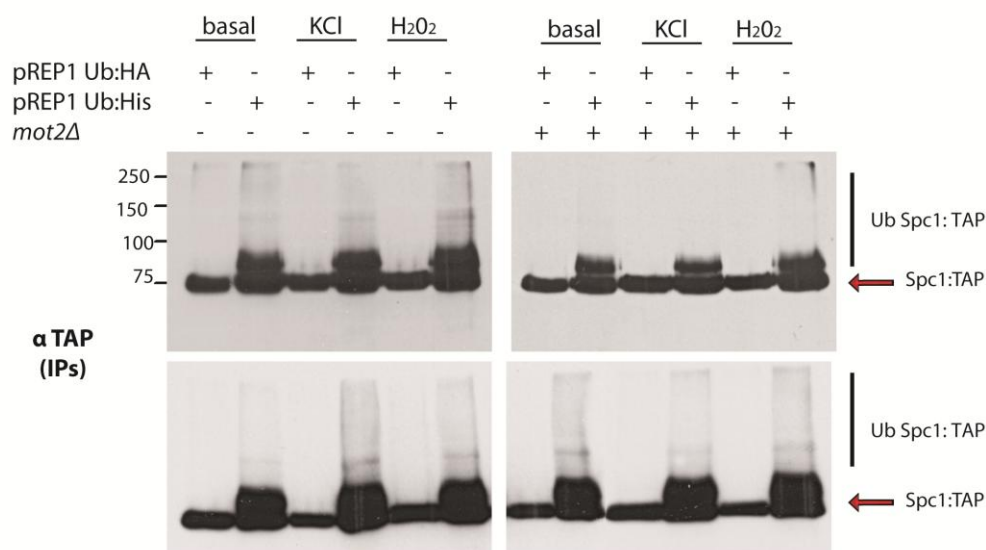


Figura 47. La ausencia de Mot2 o Fbh1 no modifica la ubiquitinación de Spc1. Los cultivos en fase exponencial fueron tratados o no con KCl 0.6 M o H₂O₂ 1 mM durante 15 min y luego se realizó un experimento de copurificación purificando Ubiquitina:His codificada en el plásmido pREP1-Ub:His con resinas de Níquel y detectando Spc1:TAP por WB. Como control negativo se purificó Ubiquitina:HA expresada en el plásmido pREP1-Ub:HA. Ub Spc1: Spc1 ubiquitinada.

Los resultados indican que ni Fbh1 ni Mot2 serían las ubiquitin ligasas de Spc1, o que, de serlo, no serían las únicas. Por lo tanto, Mot2, el componente del complejo Ccr4-Not que hipotéticamente podría estar modificando a Spc1, no pareciera estar relacionado con su ubiquitinación. Sin embargo, aunque no se puede asignar un papel al complejo Ccr4-Not en la regulación post-traducciona de Spc1, continuamos con el análisis de la modificación de Spc1 por ubiquitinación para estudiar si ésta tiene una relevancia fisiológica.

7.5 Sitio de ubiquitinación de Spc1

Dado que la ubiquitinación ocurre en residuos de lisina, decidimos estudiar si alguna de las lisinas de Spc1 aparentemente importantes funcionalmente, está modificada por ubiquitinación.

De esta manera, clonamos el gen de *spc1* en el plásmido pREP42-HA y luego realizamos la mutagénesis dirigida de las lisinas 49, 143, 38 y 156 por arginina. La elección de las lisinas a mutar la realizamos en base el modelo 3D de la proteína Spc1 y a los roles funcionales de estos residuos en la actividad de Spc1. La lisina 49 se encuentra en el sitio activo de Spc1, por lo tanto la mutación K49R genera una kinasa catalíticamente inactiva (*kinase*

dead). La lisina 38 se encuentra cercana al sitio activo. Las lisina 143 y 156 se encuentran cercanas al sitio de entrada del ATP.

Primero, se transformó una cepa *spc1Δ* con los plásmidos pREP42 con *spc1* mutada en las diferentes lisinas y a continuación transformamos las cepas mutantes con el plásmido pREP1-Ub:His para realizar ensayos de viabilidad y ensayos de copurificación.

a) *Fenotipo de las cepas de Spc1 mutadas en las lisinas 38, 49, 143 y 156*

Realizamos ensayos de viabilidad para estudiar la sensibilidad de las cepas de Spc1 mutantes en condiciones de estrés osmótico (KCl), oxidativo (H_2O_2), alta temperatura ($37^\circ C$) y en presencia de drogas de inhibición de la elongación (6-azauracilo), condiciones en las cuales una cepa delecionada en *spc1* es sensible. De esta manera, observamos si las cepas mutantes en las diferentes lisinas de Spc1 contribuyen en algunas de las funciones descriptas para Spc1.

Los resultados indicaron que la cepa con Spc1 mutada en la lisina 49 (K49R) (kinasa catalíticamente inactiva) y la K143R (sitio de entrada del ATP), son sensibles principalmente a estrés oxidativo y en los otros tipos de estrés no hay una sensibilidad marcada (Figura 6). Lo mismo sucede al inhibir la elongación con 6-azauracilo. Las cepas con Spc1 mutadas en las lisinas 38 y 156 no presentaron sensibilidad en ninguna de las condiciones ensayadas, por el contrario presentaron mayor crecimiento (Fig. 48).

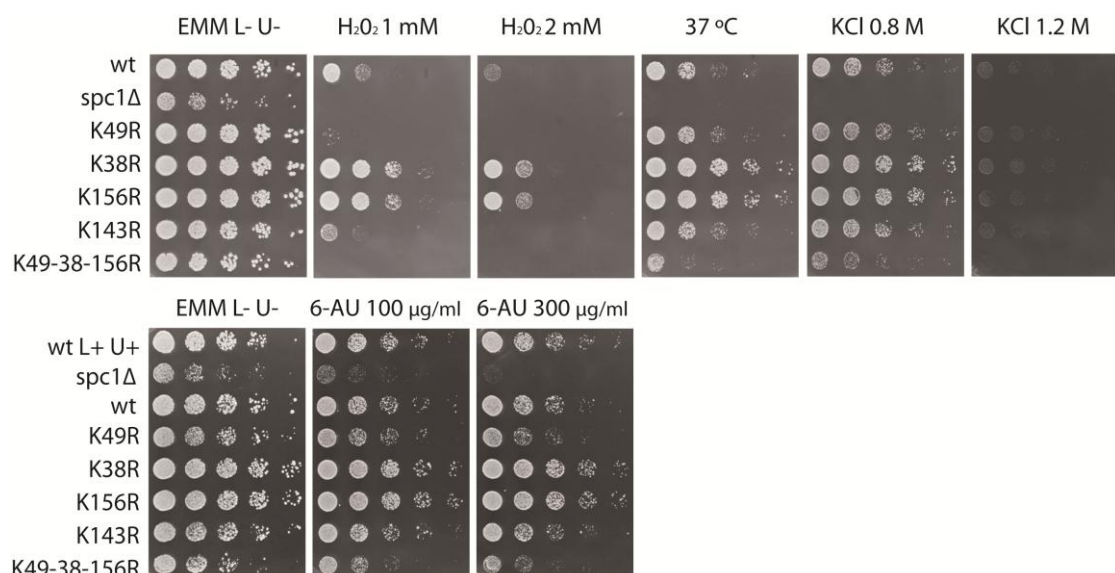


Figura 48. Ensayos de sensibilidad de cepas mutantes de Spc1. Las cepas wt (transformada con pREP42-HA y pREP1-Ub:His), wt L+U+ (protótrofa), *spc1Δ* (transformada con pREP42-HA y pREP1-Ub:His), K49R, K38R, K156R, K143R, K49-58-156R (*spc1Δ* transformadas con pREP42-Spc1 mutada K-R:HA y pREP1-Ub:His) fueron cultivadas en medio mínimo hasta fase exponencial y luego se realizaron diluciones seriadas y ensayo de viabilidad en placas de medio mínimo con diferentes concentraciones de H_2O_2 , KCl, 6-azauracilo (6-AU) a $30^\circ C$ o $37^\circ C$.

b) Fosforilación de Spc1 en las cepas mutantes

Para observar si los cambios en la sensibilidad de las cepas de Spc1 con las lisinas mutadas se deben a una fosforilación defectuosa de Spc1 se analizó la fosforilación de Spc1 por WB a distintos tiempos de tratamiento (15 y 30 min) con estrés osmótico (0.6 M de KCl).

La fosforilación de Spc1 fue similar a la cepa silvestre en todas las cepas, a excepción de la cepa K49R en la cual se observaron altos niveles basales de Spc1 (Fig. 49).

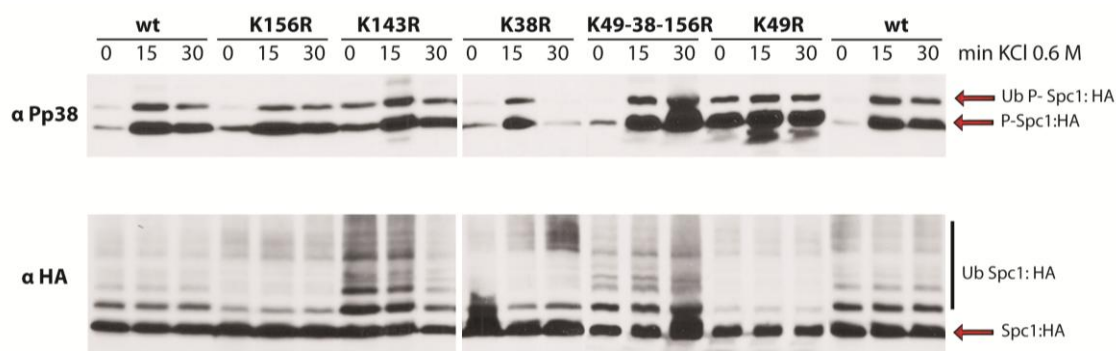


Figura 49. Fosforilación de Spc1 en las cepas mutantes. Las cepas wt (transformada con pREP42-HA y pREP1-Ub:His), K49R, K38R, K156R, K143R, K49-58-156R (*spc1Δ* transformadas con pREP42-Spc1 mutada K-R:HA y pREP1-Ub:His) fueron cultivadas en medio mínimo hasta fase exponencial y se realizó el tratamiento con 0.6 M de KCl por 15 o 30 min. Luego se realizaron extractos con TCA y se detectó la fosforilación de Spc1 con el anticuerpo anti P-p38 por WB.

La sensibilidad o resistencia de las cepas mutantes en las lisinas 38, 49, 143 y 156 no pareciera ser consecuencia de la fosforilación de Spc1. Este resultado sugiere que estas lisinas estudiadas están relacionadas posiblemente a otra modificación de Spc1 o en la fosforilación de los sustratos de Spc1.

c) Las lisinas de Spc1 analizadas no son modificadas por ubiquitinación

Para observar si la ubiquitinación de Spc1 ocurre en alguna de las lisinas mutadas, realizamos ensayos de copurificación de Spc1:HA mutada en las diferentes lisinas con Ub:His.

La ubiquitinación de Spc1 no varió en los mutantes de las lisinas analizados en tanto condiciones basales como de estrés osmótico (0.6 M KCl 15 min) u oxidativo (1 mM H₂O₂ 15 min). Además, en el triple mutante K49R K38R K156R el perfil de ubiquitinación de Spc1 es

similar al de una cepa silvestre (Fig. 50). Por lo tanto, los resultados indican que la ubiquitinación de Spc1 no ocurre en estas lisinas.

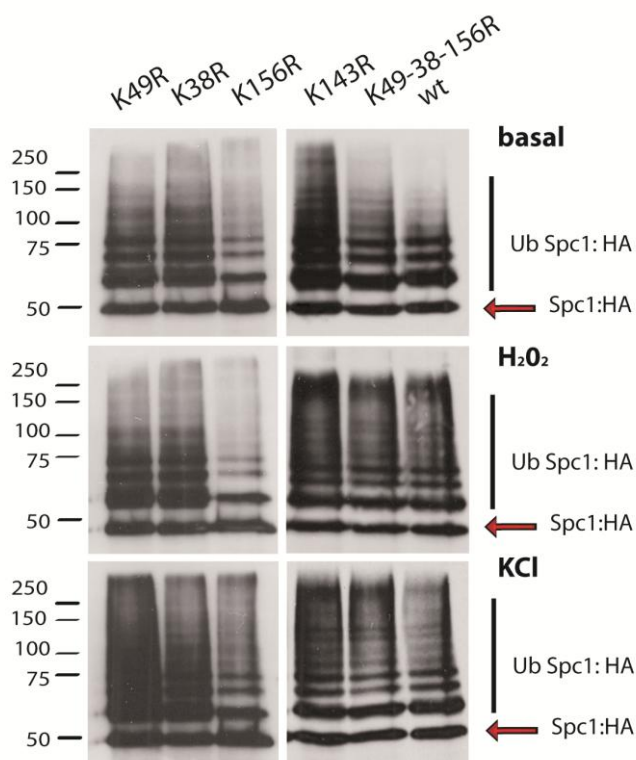


Figura 50. La ubiquitinación de Spc1 no depende de las lisinas 49, 38, 143 y 156. Las cepas K49R, K38R, K156R, K143R, K49-58-156R (*spc1Δ* transformadas con pREP42-Spc1 mutada K-R:HA y pREP1-Ub:His) fueron cultivadas en medio mínimo hasta fase exponencial y se trataron o no con KCl 0.6 M o H₂O₂ 1 mM durante 15 min. Luego se realizó un experimento de copurificación purificando Ubiquitina:His codificada en el plásmido pREP1-Ub:His con resinas de Níquel y detectando Spc1:HA por WB. Ub Spc1: Spc1 ubiquitinada.

Como conclusión de los resultados de este apartado, hemos encontrado que Spc1 se ubiquitina y que esta modificación ocurre tanto en condiciones basales como de estrés oxidativo u osmótico. La ubiquitinación de Spc1 no parece ser necesaria para su degradación por el proteasoma, por lo tanto posiblemente sea una modificación reguladora de su actividad.

Las lisinas estudiadas 38, 49, 143 y 156 no son el sitio de ubiquitinación de Spc1, pero todavía queda estudiar el resto de lisinas de la proteína. Por último Mot2 no es la ubiquitin ligasa de Spc1, ni tampoco Fbh1, la ubiquitin ligasa de su sustrato Atf1. Por lo tanto, no pareciera haber un papel evidente del complejo Ccr4-Not en la ubiquitinación de Spc1.

DISCUSIÓN

La respuesta a estrés en eucariotas está coordinada principalmente por vías de MAPKs. En *S. pombe* la principal vía de respuesta a estrés está mediada por la MAPK Spc1 que desempeña un papel central en la regulación de esta respuesta, que está dada principalmente a nivel de la fosforilación de sus sustratos. Es el caso de Atf1 que desencadena en parte la respuesta transcripcional global de defensa contra el estrés (CESR). Sin embargo el fenotipo de *spc1Δ* es más sensible que *atf1Δ* a diferentes tipos de estrés y la respuesta transcripcional en una cepa *spc1Δ* está más desregulada que en una cepa *atf1Δ* (Chen *et al.* 2003). Lo mismo ocurre con el resto de los sustratos conocidos para Spc1.

Un interrogante de la vía es cómo se consigue una respuesta específica a cada tipo de estrés mediante una misma vía de señalización. Se han realizado esfuerzos en responder a esta pregunta y se ha demostrado que, por ejemplo, los diferentes tipos de estrés son detectados en diferentes niveles de la vía (ver Introducción).

En la búsqueda de proteínas que aporten especificidad a la vía, nuestro grupo describió Csx1, una proteína de unión a ARN (ARNbp-ARN *binding protein*) que responde de manera específica a estrés oxidativo. Csx1 es fosforilada en respuesta a estrés oxidativo y esta fosforilación es dependiente de Spc1 (Rodríguez-Gabriel *et al.* 2003). Csx1 tiene un papel en la regulación post-transcripcional, mediante la modulación de la estabilidad de ARNm de respuesta a estrés dependientes muchos de ellos de Spc1. Sin embargo los perfiles transcripcionales en respuesta a estrés de *spc1Δ*, *atf1Δ* y *csx1Δ* coinciden parcialmente, lo que implica que deben existir otras proteínas reguladoras. Por último, al igual que con Atf1, la delección de *csx1* es menos deletérea que la de *spc1* en condiciones de estrés oxidativo. Por lo tanto pareciera que, o bien hay otros sustratos de Spc1 que se desconocen, o Spc1 no solo es necesaria por su función kinasa sino también por su papel estructural.

Además, tanto Spc1 (Shiozaki & Russell 1996) como Csx1 (Matia-Gonzalez *et al.* 2012) participan en la vía de diferenciación sexual. Ambas proteínas regulan al factor de transcripción Ste11, Spc1 mediante el factor de transcripción Atf1 (que regula a su vez la transcripción de Ste11) y Csx1 regulando la estabilidad de su ARNm.

1. LA MAPK SPC1 Y LA ARNBP CSX1 INTERACCIONAN CON NOT1 DEL COMPLEJO CCR4-NOT

En la búsqueda de nuevas proteínas que participen en la respuesta a estrés mediada por Spc1 y que confieran especificidad a la vía, se realizó previamente en el laboratorio la purificación de Spc1 y de Csx1 por TAP. De esta manera, se pretendía encontrar proteínas candidatas que interaccionen con ambas proteínas y que puedan conferir un posible nexo de

unión entre las mismas y arrojen pistas sobre los “factores desconocidos” que modulan la respuesta a estrés.

Se realizó el análisis de los datos y entre las proteínas copurificadas tanto con Spc1 como con Csx1, nos llamó especialmente la atención la proteína Not1, el componente *scaffold* del complejo Ccr4-Not. El complejo Ccr4-Not ha cobrado un interés central en los últimos años tanto en el estudio de levaduras como de otras especies modelo como *D. melanogaster* y *C. elegans* y también en mamíferos. La principal importancia de este complejo es la cantidad de funciones a las que se asocian sus componentes en la regulación de la expresión génica y en la modificación post-traducciona de proteínas. El complejo no pareciera actuar de una forma aislada, sino como un conjunto, brindando una plataforma para regular y coordinar diferentes procesos celulares, aunque también se ha sugerido que algunas proteínas podrían tener función fuera del complejo (Collart & Panasenko 2012).

Un complejo como tal, interaccionando con componentes de la vía de respuesta a estrés y de diferenciación sexual como Spc1 y Csx1, podría aportar información sobre cómo se regula esta vía. Por este motivo, centramos nuestro trabajo en estudiar dos interrogantes: cómo está conectado el complejo Ccr4-Not con la MAPK Spc1 y cuál es el papel del complejo Ccr4-Not en la vía de respuesta a estrés.

2. RELACIÓN DE SPC1 CON EL COMPLEJO CCR4-NOT

2.1 Interacciones bioquímicas

Los resultados presentados en esta memoria, sustentan que la MAPK Spc1 y la ARNbp Csx1 interaccionan con el complejo Ccr4-Not. Tanto los experimentos de proteómica, como las validaciones individuales por Co-IP de las interacciones de Spc1 y Csx1 con Not1 reafirman la interacción tanto en condiciones basales como de estrés (Fig. 14 y 15).

Dado que este complejo presenta varios componentes como Not2, Not3, Mot2, Caf1, Ccr4, Rcd1 y Not1, que es la proteína *scaffold*, estudiamos de qué manera Spc1 interacciona con cada uno. Mediante la Co-IP de Spc1 con Not1 en los mutantes de delección de estos componentes (Fig. 17) y mediante Co-IP *in vitro* entre Spc1 y distintas regiones de Not1 (Fig. 16), obtuvimos que Spc1 interacciona con Not1 directamente en la zona N-terminal y además con otros componentes del complejo como Caf1 y Ccr4 que estarían mediando la unión entre Spc1 y Not1. Además otros componentes parecieran competir por el sitio de unión de Spc1 con Not1 como Mot2 y Rcd1.

La observación de que Caf1 y Ccr4 están interaccionando con Spc1 (Fig. 26) y mediando la interacción de ésta con Not1, parece la más convincente. Además, tanto Caf1 como Ccr4 interaccionan en la zona N- terminal de Not1, lo que también sugieren los ensayos de Co-IP *in vitro* (Fig. 16) para Spc1.

En un estudio reciente en *S. cerevisiae* se ha obtenido la estructura del complejo Ccr4-Not mediante la purificación de Not1 por TAP seguido de *cross-linking* en un gradiente de glicerol y microscopía electrónica. En dicho trabajo, se describe que Not1 presenta dos brazos y que Caf1 y Ccr4 interaccionan en la región de transición entre los dos brazos (Nasertorabi *et al.* 2011). Originalmente se mapeó por doble híbrido en *S. cerevisiae* la interacción de Caf1 y Ccr4 en los residuos 667-1152 de Not1 (Bai *et al.* 1999). En otro estudio más reciente, sobre la estructura del módulo Not1-Caf1-Ccr4, se demuestra por cristalografía que Caf1 interacciona entre los residuos 754-1000 de Not1, que corresponden a uno de los dominios esenciales para su función (Basquin *et al.* 2012). La zona de interacción de Caf1 y Ccr4 con Not1, coincide con el que sugieren los ensayos de Co-IP *in vitro* para Spc1, solapando principalmente con la región Not1-635 (Fig. 51).

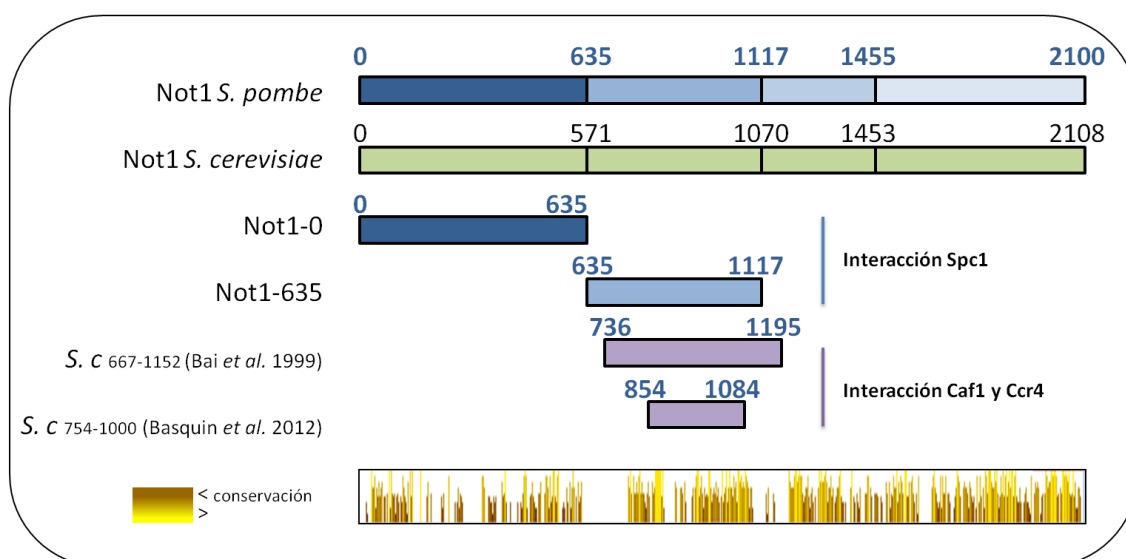


Figura 51. Sitio de interacción de Spc1, Caf1 y Ccr4 con Not1. En azul se muestran los residuos correspondientes a Not1 de *S. pombe* y en negro los de *S. cerevisiae* (*S. c*). Las regiones Not1-0 y Not1-635 interaccionan con Spc1 *in vitro*. En la parte inferior se muestra la conservación de la secuencia de Not1 en eucariotas (Fig. 11).

La región de Not1, Not1-0 que se detectó copurificando con Spc1, presentó copurificación en el control negativo. Por lo tanto probablemente Spc1 no interaccione con Not1 en esta zona.

En humanos, se plantea que la interacción entre Not1 y Caf1 conecta el módulo “Not” (Not1, Not2, Not3) al módulo catalítico (Caf1, Ccr4) y por lo tanto es esencial para el ensamblaje del complejo Ccr4-Not. Por Co-IP y cristalografía, el grupo de Petit y colaboradores demostraron que la zona de unión de Caf1 y Ccr4 a Not1 se encuentra entre los residuos 1093–1317, una región que se encuentra altamente conservada en eucariotas (Petit *et al.* 2012).

Por lo tanto, estos datos indican que la unión de Ccr4, Caf1 y Not1 está conservada y validan el planteamiento de un modelo en el cual en *S. pombe* y posiblemente en otros eucariotas, la MAPK de respuesta a estrés Spc1 interacciona conjuntamente con Not1 y con Caf1 y Ccr4 en la zona N-terminal de Not1, entre los aminoácidos 635-1117. Caf1 y Ccr4 son necesarias para que se una correctamente Spc1 a Not1. Sin embargo no sucede lo contrario, y como hemos demostrado en la Figura 33, Spc1 no es necesaria para la unión de Caf1 y Ccr4 a Not1 (Fig. 52).

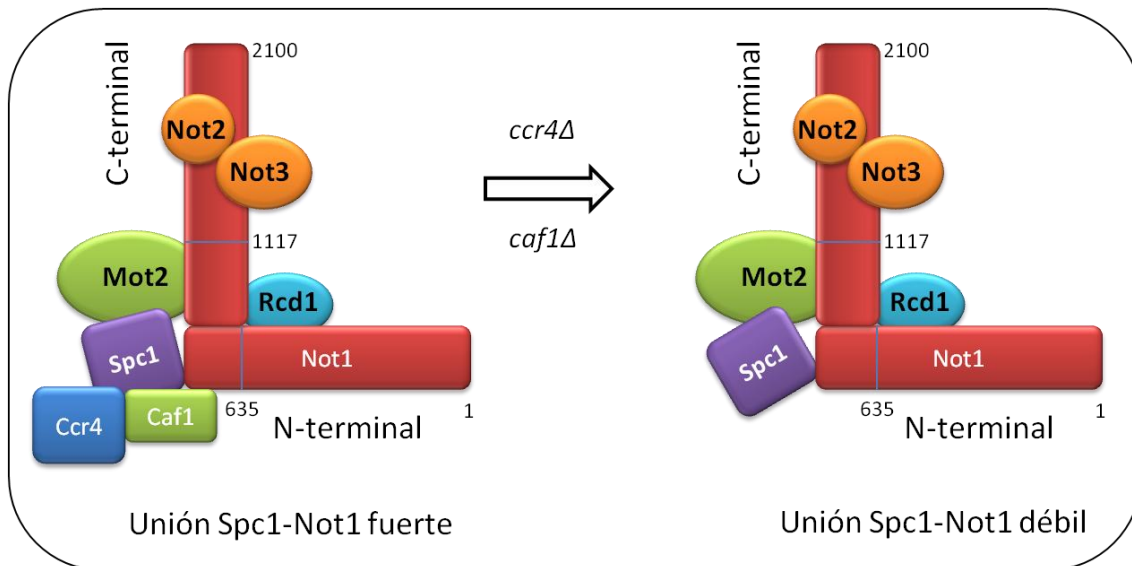


Figura 52. Modelo de interacción de Spc1 con el complejo Ccr4-Not. Interacción con Not1-Caf1-Ccr4

Con respecto a los componentes del complejo Ccr4-Not, Mot2 y Rcd1, cuya delección generó un aumento en la Co-IP detectada para Spc1 con Not1. Mot2 interacciona en *S. cerevisiae* entre los residuos 1430-1862 y Rcd1 interacciona en la zona media de Not1. Como hablamos de un complejo donde varias proteínas interaccionan entre sí, no es sorprendente que al eliminar alguno de estos componentes la estequiometría en las interacciones de los otros componentes varíe (Fig. 53).

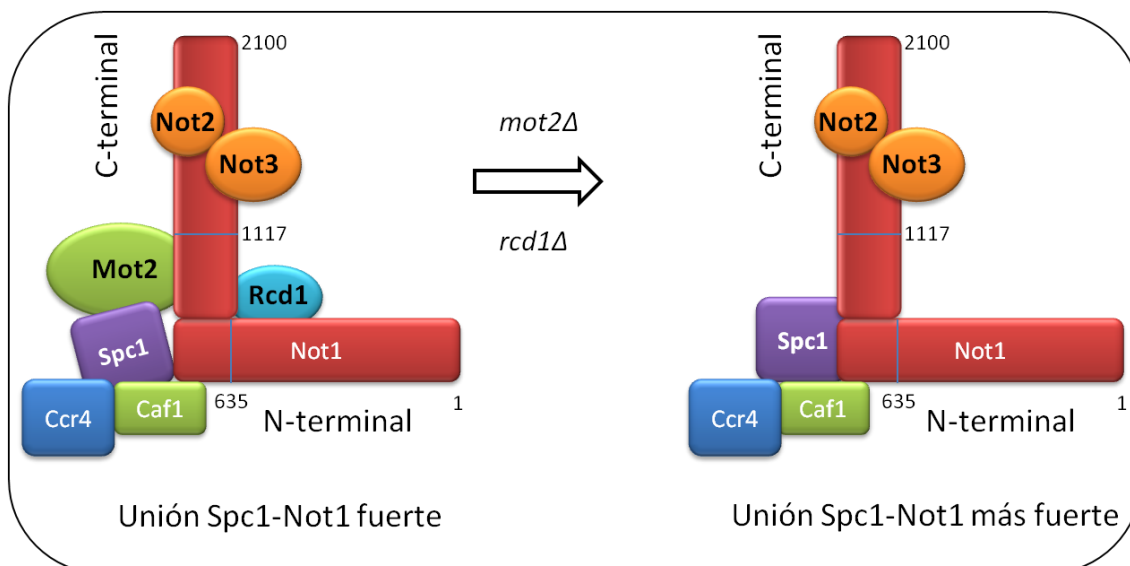


Figura 53. Modelo de interacción de Spc1 con el complejo Ccr4-Not. Interacción con Not1-Mot2-Rcd1

Se sabe que el complejo Ccr4-Not interacciona con otras proteínas e incluso otros complejos celulares. Por este motivo, también estudiamos el papel de algunas de estas proteínas en la interacción de Spc1 con Not1 como Caf4, Caf16, Btf3, Ada2 (SAGA), Srb9, Srb10, Srb11 y Pmc2 (Mediador) y Csx1 (por nuestros resultados). Obtuvimos que la delección de *caf16* generó un aumento en la copurificación de Spc1 con Not1 mientras que en las delecciones de *btf3*, *ada2*, *srb10* y *csx1* se observó una disminución de la Co-IP entre Spc1 y Not1. Caf4 y Caf16 interaccionan por Co-IP con Ccr4, y Caf4 interacciona a su vez con Not2 (Liu *et al.* 2001). Ada2 también interacciona con Not2 (Benson *et al.* 1998) y Srb10 interacciona por doble híbrido con Not1, Not2 y Caf4 (Liu *et al.* 2001), Btf3 pertenece al complejo asociado a polipéptidos nascentes (NAC) e interacciona con Caf130 un componente del complejo Ccr4-Not de *S. cerevisiae* no hallado en otros eucariotas. De estas observaciones, la más llamativa es que Csx1 estaría facilitando la unión entre Spc1 y el complejo Ccr4-Not, al igual que las deadenilasas Ccr4 y Caf1 (Fig. 51). Csx1 está implicada en la estabilización de ARNm de respuesta a estrés oxidativo, por lo tanto es interesante estudiar si esta función depende de la asociación con complejo proteico de Spc1-Caf1-Ccr4.

Todas las evidencias encontradas sustentan la afirmación de que la MAPK Spc1 interacciona con el complejo Ccr4-Not. No nos aventuraríamos a decir que es un componente más del complejo porque para ello se deberían hacer experimentos dirigidos a comprobar directamente esta hipótesis, como los experimentos de filtración en gel realizados al describir la estructura del complejo (Liu *et al.* 1998) y detectar a Spc1 en la forma de 0.9-1.2 MDa. Si se detecta en agregados mayores, como el de 2 MDa hablaríamos de una interacción accesoria del complejo, que es lo que esperaríamos dado que, hasta nuestro conocimiento, no se han

detectado a los homólogos de Spc1, Hog1 y p38 en experimentos similares en *S. cerevisiae* y mamíferos, respectivamente.

Según nuestra información, este es el primer trabajo que vincula a una MAPK con el complejo Ccr4-Not. Respecto a otras kinasas, se ha hallado a la kinasa Srb10, ya nombrada, y en un estudio global en *S. cerevisiae* de las interacciones de la mayoría de las kinasas, Caf16 (que interacciona con Ccr4 del complejo) se encontró interaccionando con la kinasa Kss1 que a su vez interacciona con una de las fosfatasa de Hog1 (homóloga de Spc1), en este estudio no se incluyó a Hog1 (Fasolo *et al.* 2011).

Un experimento que estamos realizando para ampliar la información de la interacción de Spc1 con el complejo Ccr4-Not es mediante nuevas purificaciones de Spc1 y Not1 por TAP utilizando la estrategia de proteómica cuantitativa de SILAC (*Stable Isotope Labeling by Aminoacids in Cell culture*). De esta manera, pretendemos encontrar nuevos candidatos que interaccionen con Spc1 y con Not1 en condiciones de estrés oxidativo u osmótico. Todavía no hemos hallado tales candidatos en los resultados preliminares, pero esta es una buena estrategia para estudiar las interacciones de un complejo como Ccr4-Not y completar el conocimiento de cómo participa un complejo como éste en la respuesta a estrés.

2.2 Relevancia funcional

En *S. cerevisiae* se ha descrito que Not1, Not3, Not5, y Caf1 son fosfoproteínas (Ficarro *et al.* 2003; Lenssen *et al.* 2002; Moriya *et al.* 2001), y el estado de fosforilación de estas proteínas cambia, por ejemplo, si se quita glucosa del medio de cultivo. Sin embargo, en nuestras condiciones, no hemos podido observar modificaciones post-traduccionales en Caf1 o Ccr4 en respuesta a estrés. Una hipótesis obvia es que Spc1 fuese la kinasa de algún componente del complejo. Por ello, realizamos ensayos kinasa para estudiar si Spc1 fosforila o media la fosforilación de Caf1, Ccr4 y Not1 (no mostrado) y concluimos que Caf1 es una fosfoproteína pero que su fosforilación no depende de la presencia de Spc1 (Fig. 32).

3. PAPEL DEL COMPLEJO CCR4-NOT EN LA RESPUESTA A ESTRÉS Y LA DIFERENCIACIÓN SEXUAL

3.1 Sensibilidad a estrés oxidativo y osmótico

Hemos descrito que el complejo Ccr4-Not es necesario para responder a estrés osmótico y oxidativo en *S. pombe*. La mayoría de los componentes del complejo presentaron

sensibilidad en los ensayos de viabilidad (Not2, Not3, Mot2, Caf1, Ccr4), incluso proteínas que interaccionan con el complejo como Ada2, Btf3, Srb10 también son necesarias para sobrevivir al estrés (Fig. 18). En *S. pombe* ya se habían encontrado que algunos de los componentes del complejo son necesarios para responder a otros tipos de estrés, como Caf1 y Ccr4 en la respuesta a cafeína (Calvo *et al.* 2009) y Caf1, Ccr4, Not2 y Rcd1 en la respuesta a daño en el ADN con HU, MMS, UV (Deshpande *et al.* 2009).

En el caso de Ada2 del complejo SAGA también ha sido descrita su sensibilidad a estrés oxidativo en trabajos previos (Sanso *et al.* 2011a). Y en relación a Srb10, en *S. cerevisiae* se ha demostrado que esta kinasa interacciona con el factor de transcripción Skn7 que regula la respuesta a estrés osmótico de una manera Hog1-independiente (Lenssen *et al.* 2007).

En relación a otros tipos de estrés, como ya ha sido descrito en la Introducción, en *S. cerevisiae*, se ha vinculado al complejo a la respuesta por ausencia de glucosa mediante la represión o expresión de genes (Denis & Malvar 1990; Sakai *et al.* 1992). En todos los mutantes del complejo, la activación transcripcional por Msn2, el factor de transcripción que media la respuesta a estrés ambiental está aumentada (Lenssen *et al.* 2002). También se ha observado que el complejo es necesario para la respuesta a Li^+ o Mg^{2+} (Liu *et al.* 1998), la delección en *ccr4* y *caf1* genera sensibilidad a radiación UV (Schild 1995), y Ccr4, Caf1 y Not4 (Mot2) son necesarios para el crecimiento en condiciones de alta presión y alta temperatura (Abe F 2008).

También varios estudios genómicos han revelado un rol para el complejo en la respuesta a daño de ADN, primero en *S. cerevisiae* (Mulder *et al.* 2005; Takahashi *et al.* 2007; Traven *et al.* 2005) y luego en *S. pombe* (Deshpande *et al.* 2009).

En relación a estrés por alta temperatura, en *S. pombe* obtuvimos que la mayoría de los componentes son resistentes a este estrés (Fig. 19), lo que concuerda con lo descrito para *S. cerevisiae* (Lenssen *et al.* 2002). Esto es interesante porque implica especificidad de función de estas proteínas en unos estreses determinados y no en otros, y la conservación funcional en especies distintas.

Por lo tanto sí hay evidencias de que el complejo Ccr4-Not participe en vías de estrés, pero los estudios son aislados y no se ha estudiado el mecanismo específico y cuál es la conexión del complejo con las vías de estrés.

3.2 Papel en diferenciación sexual: Ausencia de nitrógeno

Además de la sensibilidad a estrés oxidativo y osmótico, hemos observado que todos los componentes del complejo y principalmente Caf1, Ccr4 y Rcd1 son necesarios para responder a condiciones de ausencia de nitrógeno, y por lo tanto importantes para que se

produzca un correcto *mating* (Fig. 20). Estudiamos este fenotipo porque la vía de Spc1 es necesaria también para la diferenciación sexual. En *S. cerevisiae* ya se ha descrito que el complejo está relacionado a la reproducción sexual (Collart 2003) e incluso se ha demostrado que en *S. pombe*, Rcd1 induce la expresión de *ste11* mediante un mecanismo independiente de la vía de AMPc/PKA o la vía de Spc1 (Okazaki *et al.* 1998). Por lo tanto, todos los componentes del complejo Ccr4-Not participan de algún modo en la respuesta a estrés mediada por Spc1, respondiendo a estrés osmótico (Not2, Not3, Mot2, Ccr4, Caf1), estrés oxidativo (Mot2, Ccr4, Caf1), alta temperatura (Mot2) y privación de nitrógeno y diferenciación sexual (Not2, Not3, Mot2, Caf1, Ccr4 y Rcd1). Estos resultados indican que el complejo en su conjunto regula la respuesta a estrés.

4. RESPUESTA TRANSCRIPCIONAL A ESTRÉS

En este trabajo hemos descrito que la mayoría de los componentes necesarios para la viabilidad de *S. pombe* en condiciones de estrés oxidativo y osmótico, son necesarios para la correcta inducción de genes de respuesta a estrés dependientes de la vía de Spc1 (Fig. 23 y 24).

El complejo Ccr4-Not como ya ha sido descrito, es un regulador global de la expresión génica y sus componentes están implicados en la regulación de la transcripción, degradación de ARNm y modificación post-traduccional de proteínas. Por lo tanto, es previsible que un complejo de esta naturaleza regule la respuesta transcripcional de defensa contra el estrés. Principalmente porque la regulación de los programas de expresión génica es necesaria cuando las células se someten a cambios ambientales a los que deben hacer frente para adaptarse y sobrevivir.

Los componentes del complejo más importantes en la respuesta a estrés fueron Caf1 y Ccr4. Su ausencia genera una marcada sensibilidad a estrés, que en el caso de estrés osmótico fue similar a una cepa *spc1Δ*. Los dos componentes también son los más necesarios para la correcta inducción de genes de estrés. La regulación de mensajeros por Caf1 y Ccr4 ha sido extensamente estudiada en *S. cerevisiae* y en mamíferos debido a su papel en deadenilación de ARNm. Se concibe que estas dos proteínas son las principales deadenilasas de la célula (Tucker *et al.* 2001) y por lo tanto regulan la degradación de un gran número de ARNm. La importancia de estas deadenilasas ha sido revisada en eucariotas (Doidge *et al.* 2012; Wahle & Winkler 2013).

Respecto a la deadenilación y la respuesta a estrés en levaduras, se ha demostrado que el *turnover* de ARNm es más lento en privación de amino ácidos y en estrés osmótico (Benard 2004; Greatrix & van Vuuren 2006; Todeschini *et al.* 2006). En células de mamíferos el choque

térmico estabiliza ARNs que contienen AREs y en *D. melanogaster* afecta la deadenilación y degradación de ARNm (Dellavalle *et al.* 1994; Laroia *et al.* 1999; Zhao *et al.* 2002), en células HeLa varios estreses como UV, H₂O₂, choque térmico, estrés osmótico inhiben la deadenilación y degradación (Gowrishankar *et al.* 2006). En *S. cerevisiae* se ha establecido un rol de la deadenilación y de las deadenilasas Caf1 y Ccr4 en respuesta a estrés (Hilgers *et al.* 2006).

Para nuestra sorpresa la regulación de Caf1 y Ccr4 de los genes inducidos por estrés estudiados resultó ser transcripcional en lugar que post-transcripcional (deadenilación y degradación). Así, observamos que la ausencia de estas proteínas disminuye la inducción de genes de estrés y que esta disminución no es un efecto indirecto: Ccr4 se une a genes de estrés directamente (Fig. 34) y Caf1 es necesaria para el correcto reclutamiento de PolII a estos genes. En ausencia de Caf1 hay menor unión de PolII a las zonas promotor, codificante y terminadora de genes de estrés como *ctt1* y *atf1* (Fig. 35 y 36). Por lo tanto las deadenilasas Caf1 y Ccr4 de la maquinaria de degradación están involucradas en la regulación transcripcional en condiciones de estrés en *S. pombe*.

En *S. cerevisiae* ya se ha descrito que Ccr4 y otros componentes del complejo son reclutados a genes transcripcionalmente activos (Kruk *et al.* 2011; Mulder *et al.* 2007; Swanson *et al.* 2003; Venters *et al.*). Interesantemente, en condiciones basales, también se ha sugerido que el complejo Ccr4-Not es un factor de elongación (Reese 2012). Las evidencias que apoyan esta afirmación son: 1- la mayoría de las delecciones de sus componentes son sensibles a drogas de inhibición de la elongación como 6-azauracilo y presentan interacción sintética letal con mutaciones en factores de elongación (Denis *et al.* 2001; Gaillard *et al.* 2009; Mulder *et al.* 2007), 2- se ha observado que en mutantes del complejo, la densidad de PolII aumenta en el 3' de los genes sugiriendo un amontonamiento de la polimerasa, esto se ha observado utilizando un gen reportero (Kruk *et al.* 2011) y a gran escala en *ccr4Δ* (Rodríguez-Gil *et al.* 2010). En base a estos estudios se ha sugerido que el complejo es necesario para promover la transcripción luego de bloqueos naturales de la elongación, 3- se ha demostrado por Co-IP que el complejo se une a PolII de una manera CTD independiente y que esta interacción requiere del subcomplejo Rpb4/7 que, interesantemente, contribuye a unir la iniciación de la transcripción con la maquinaria post-transcripcional y por lo tanto es un punto de unión entre la síntesis y degradación de ARN (Dori-Bachash *et al.* 2011; Perez-Ortin *et al.* 2012; Schwalb *et al.* 2012; Shalem *et al.* 2011).

Nosotros hemos observado que Caf1 y Ccr4 son necesarios también para la fase de elongación de la transcripción de genes inducidos por estrés. Los resultados que apoyan esta conclusión, son la sensibilidad de *caf1Δ* y *ccr4Δ* a 6-AU, la doble delección con un factor de elongación es sintética letal (Fig. 38), la acumulación de Ccr4 en ORF de genes de estrés en respuesta a H₂O₂ (Fig. 34) y el aumento de la unión de la PolII fosforilada en Ser2-CTD en

respuesta a H_2O_2 en una cepa *caf1Δ* (Fig. 40). Además también hemos observado que, al igual que en *S. cerevisiae*, la mayoría de los componentes son necesarios para sobrevivir a 6-AU (datos no mostrados), lo que implica que el complejo en su conjunto también podría ser un factor de elongación en *S. pombe* como sugiere Reese en *S. cerevisiae* (Reese 2012) y posiblemente esté conservado en metazoos.

En el estudio de Hilgers y colaboradores (Hilgers *et al.* 2006) en *S. cerevisiae*, se demuestra que en condiciones de estrés osmótico (1 M KCl), privación de glucosa o choque térmico, se inhibe la deadenilación mediante la inhibición de las deadenilasas Ccr4 (principalmente) y Pan2. En este estudio se analizó la degradación del reportero MFA2pG bajo el control del promotor de galactosa y reprimible por glucosa. Y para el caso de la ausencia de glucosa, se utilizó la cepa *rpb1-1* termosensible para reprimir la transcripción. Los autores sugieren dos modelos, 1- que los diferentes tipos de estrés pueden inducir a que los complejos Ccr4/Caf1/Not1 y Pan2/Pan3 sufran modificaciones post-traduccionales que inactiven su función y la deadenilación o 2- los diferentes estreses puedan conducir a alteraciones en la composición del ARNm como que por ejemplo la cola de poli(A) este menos disponible para la deadenilación. Nuestros datos sugieren que lo que podría estar pasando en estrés es que las deadenilasas Caf1 y Ccr4 sean reclutadas por el complejo Ccr4-Not y por Spc1 para realizar roles transcripcionales en el núcleo, como factores de elongación, quedando no disponibles para realizar el papel de deadenilación en el citoplasma (Fig. 54).

Algunas evidencias de la bibliografía apoyan nuestro modelo. En el análisis de la respuesta global de las tasas de síntesis y degradación de ARNm en *S. cerevisiae* y *S. pombe* se observó que la delección de *caf1* y *ccr4* disminuye la tasa de degradación de mensajeros, pero también la de síntesis (Sun *et al.* 2012). En un estudio reciente en levaduras (Haimovich *et al.* 2013), se describe cómo componentes de la maquinaria de degradación son necesarios para la maquinaria transcripcional. Así la transcripción de la mayoría de los genes estudiados disminuye en cepas delecionadas en los componentes de la maquinaria de degradación 5'-3' ("Decaysome").

Estos estudios encajan con nuestros resultados que implican a las deadenilasas Caf1 y Ccr4 en la regulación transcripcional de defensa contra el estrés en *S. pombe*. Hemos encontrado que el mecanismo es mediante la regulación de la elongación de la transcripción, lo que ya ha sido descrito para *S. cerevisiae* en condiciones basales y utilizando sistemas reporteros. Nuestros resultados apoyan el modelo propuesto por Haimovich y colaboradores (Haimovich *et al.* 2013) y sugerido por otros (Dori-Bachash *et al.* 2011; Perez-Ortin *et al.* 2012; Schwalb *et al.* 2012; Shalem *et al.* 2011; Sun *et al.* 2012), que la maquinaria de degradación y la de síntesis están interconectadas. La regulación cíclica de ambos procesos en un proceso tan estrictamente

regulado como la respuesta a estrés debe ser crucial para la adaptación de las células a su entorno.

Además de la disminución en la inducción, observamos que a tiempos mayores de estrés oxidativo se produce un aumento en la cantidad de ARNm inducidos por estrés, mientras que en estrés osmótico no parece haber este efecto (resultado preliminar Fig. 30). Estos resultados estarían de acuerdo con nuestro modelo, y podrían indicar un cambio de regulación de transcripcional a deadenilación a tiempos más largos de estrés oxidativo por ejemplo. Este aspecto es muy interesante de seguir estudiando y estamos realizando experimentos para entender estos resultados. Además, podríamos especular que la interacción de Csx1 con el complejo Ccr4-Not podría ser uno de los acontecimientos que estén regulando este proceso.

4.1 Desregulación de *ste11* en ausencia de nitrógeno

Observamos que en condiciones de *mating* (ausencia de nitrógeno y 25°C) la expresión de *ste11* se desregula en una cepa delecionada en *caf1* (Fig. 25). Al igual que en condiciones de estrés, la abundancia del transcripto de *ste11* disminuye en *caf1Δ*, indicando que en este proceso también podría estar sucediendo una regulación transcripcional.

En *S. pombe*, hay varios estudios que relacionan a proteínas de unión a ARN con la regulación de Ste11. Entre ellas Mei2, un factor regulado a su vez por Ste11 (Watanabe & Yamamoto 1994), Msa1 y Msa2/Nrd1 (Jeong *et al.* 2004; Tsukahara *et al.* 1998), y Rcd1 un componente del complejo Ccr4-Not (Okazaki *et al.* 1998) que regulan a Ste11 de manera negativa y Csx1 que regula positivamente a Ste11 (Matia-Gonzalez *et al.* 2012). Además, también se ha demostrado que el complejo SAGA tiene un rol importante en este proceso, regulando Ste11 tanto negativa (mediante la subunidad Gcn5) como positivamente (mediante la subunidad Spt8) (Helmlinger *et al.* 2008). Incluso en nuestros resultados observamos que la subunidad Ada2 de SAGA es una reguladora negativa del *mating*.

Es interesante que tanto Spc1, Atf1, Prr1 (Shiozaki & Russell 1996) como Csx1 (Matia-Gonzalez *et al.* 2012; Rodriguez-Gabriel *et al.* 2003), el complejo SAGA (Gcn5 y Ada2) y Caf1 y Ccr4 del complejo Ccr4-Not (este trabajo) son necesarias tanto para la respuesta a estrés como para la diferenciación sexual.

La regulación de Ste11 es muy compleja y mucho se ha estudiado sobre este tema, el estudio del rol del complejo Ccr4-Not en la regulación de Ste11 es un atractivo tema de estudio y puede brindar información sobre cómo se coordina la vía de respuesta a estrés y la de diferenciación sexual.

5. ¿CÓMO ESTÁ CONECTADO EL PAPEL DEL COMPLEJO CCR4-NOT EN LA RESPUESTA A ESTRÉS Y DIFERENCIACIÓN CON LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN MEDIADA POR SPC1?

Nuestros resultados apoyan el modelo donde en respuesta a estrés el complejo Ccr4-Not participa en la regulación transcripcional. Esta regulación transcripcional está mediada también por Spc1 y Atf1 principalmente. Spc1 regula la mayoría de los genes de la respuesta global al estrés (CESR) (Chen *et al.* 2003) y Atf1 también lo hace pero en menor extensión. Spc1 fosforila a Atf1, regulando su estabilidad. Atf1 se une a promotores de genes inducidos por estrés, en una secuencia específica denominada sitio CRE. Spc1 también se une a genes inducidos por estrés de una manera Atf1 dependiente, pero también se la ha coimmunoprecipitado utilizando la técnica de ChIP, en ORF y zona terminadora de genes inducidos por estrés (Reiter *et al.* 2008). Por lo tanto, se ha relacionado a Spc1 con la elongación de la transcripción aunque no se conoce cuál es el mecanismo, cómo participa en este proceso y qué factor la recluta. En *S. cerevisiae*, la proteína homóloga de Spc1, Hog1, también ha sido localizada en zonas codificantes de genes inducidos por estrés y se plantea que esta unión es independiente de factores de transcripción (Pascual-Ahuir *et al.* 2006; Pokholok *et al.* 2006; Proft *et al.* 2006). Incluso hay evidencias de que, luego del estrés osmótico, Hog1 interacciona con PolII fosforilada en Ser2 y con componentes generales del complejo elongador de la transcripción (Proft *et al.* 2006).

Dado que Spc1 interacciona con Not1-Caf1-Ccr4 (Fig. 52), podríamos especular que esta interacción es necesaria para la correcta regulación transcripcional. Tanto Spc1 como Ccr4 se unen a genes inducidos por estrés. En los promotores, Spc1 se une de una manera Atf1 dependiente y Ccr4 no se sabe si mediado por otro factor o incluso Spc1 o Atf1. Además, Caf1, Ccr4 y Spc1 participan en la elongación de la transcripción (para Spc1 nuestros resultados muestran que *spc1Δ* es sensible a 6-AU y sintética letal con la delección de un factor de elongación como *iki3* y con *ccr4* y *caf1*), lo que podría implicar que el complejo y Spc1 actúan en conjunto. De esta manera sugerimos que el complejo Ccr4-Not puede ser el candidato reclutador, con el que interacciona Spc1, siendo parte de un factor de elongación (Fig. 54). Sin embargo Spc1 y los componentes Caf1 y Ccr4 del complejo deben tener funciones accesorias, dado que la doble delección de *spc1* y *caf1* o *ccr4* aumenta la sensibilidad a drogas de inhibición de la elongación respecto a las delecciones simples. Lo mismo que ocurre con la doble delección de *caf1* y *ccr4* tanto en presencia de 6-AU como en condiciones de estrés osmótico, oxidativo y alta temperatura (no mostrado). Este resultado es interesante porque implica que, aunque bioquímicamente Ccr4 interacciona con Caf1 y este último con el complejo Ccr4-Not, Ccr4 tiene funciones independientes a Caf1. Esto está de acuerdo con nuestros resultados que indican

que Ccr4 se une directamente a genes inducidos por estrés, mientras Caf1 es necesaria para el reclutamiento de la polimerasa. Por lo tanto, sugerimos que tanto Caf1, Ccr4 como Spc1 están presentes en el mismo complejo y actúan de manera coordinada para regular la elongación de la transcripción.

Respecto a la conexión entre Spc1 y el complejo Ccr4-Not, en mamíferos, se ha encontrado un nexo muy interesante entre la vía de p38 (homóloga a Spc1) y las deadenilasas Caf1 y Ccr4. La vía de p38 inhibe la deadenilación en respuesta a interleuquina, y el mecanismo es mediante la fosforilación de una MAPKAP (MK2) que fosforila a TTP (tristetrapolin) y esta interacciona con Caf1-Ccr4 y de esta manera disminuye la deadenilación (Marchese *et al.* 2010). En este trabajo, si Caf1 y Ccr4 no están presentes (silenciados con ARN de interferencia), lo que se observa luego del tratamiento con Interleuquina es un aumento en la cantidad de un ARNm como *cox2* que se deduce es causado por la disminución de deadenilación (similar a lo que sucede en estrés oxidativo a tiempos largos en nuestro trabajo). Es interesante que con tratamientos cortos de Interleuquina (menor a 30 min), los autores no observaron el efecto en la deadenilación. Luego Sandler y colaboradores encontraron que TTP interacciona en su C-terminal con Not1 y que esta proteína media el reclutamiento de Caf1 por TTP y es necesaria para la deadenilación (Sandler *et al.* 2011). En otro trabajo reciente, se demuestra por Co-IP *in vitro* y cristalografía que la interacción de del C- terminal de TTP con Not1 ocurre en la zona 800-1015 de Not1. Se plantea además, que en *S. cerevisiae* los residuos 571-746 de Not1 están conservados en estructura y que contienen repeticiones HEAT que son sitios de unión de proteínas (Fabian *et al.* 2013). Estos residuos están cercanos al sitio de unión de Caf1 y Ccr4 y al que hemos detectado para Spc1. Por lo tanto estos trabajos sugieren un rol para la vía homóloga a Spc1 en la deadenilación, se deberían realizar experimentos con las proteínas homologas a TTP y MK2 (Srk1) en *S. pombe* para estudiar si ocurre lo mismo que en mamíferos o si es Spc1, como sugieren nuestros resultados quien interacciona con el complejo Ccr4-Not.

En *S. pombe*, un estudio reciente sugiere que Atf1 regula la estabilidad de ARNm mediante la unión a una secuencia específica denominada M26 en el ARNm. En este trabajo se propone que tanto la regulación transcripcional como la estabilidad de mensajeros están mediadas por Atf1 y Spc1 (Gao *et al.* 2013). La unión de Spc1 y Atf1 a transcriptos está de acuerdo con el modelo que planteamos que implica la unión de Spc1 al complejo Ccr4-Not y el reclutamiento del mismo al núcleo para regular la transcripción (Fig. 54).

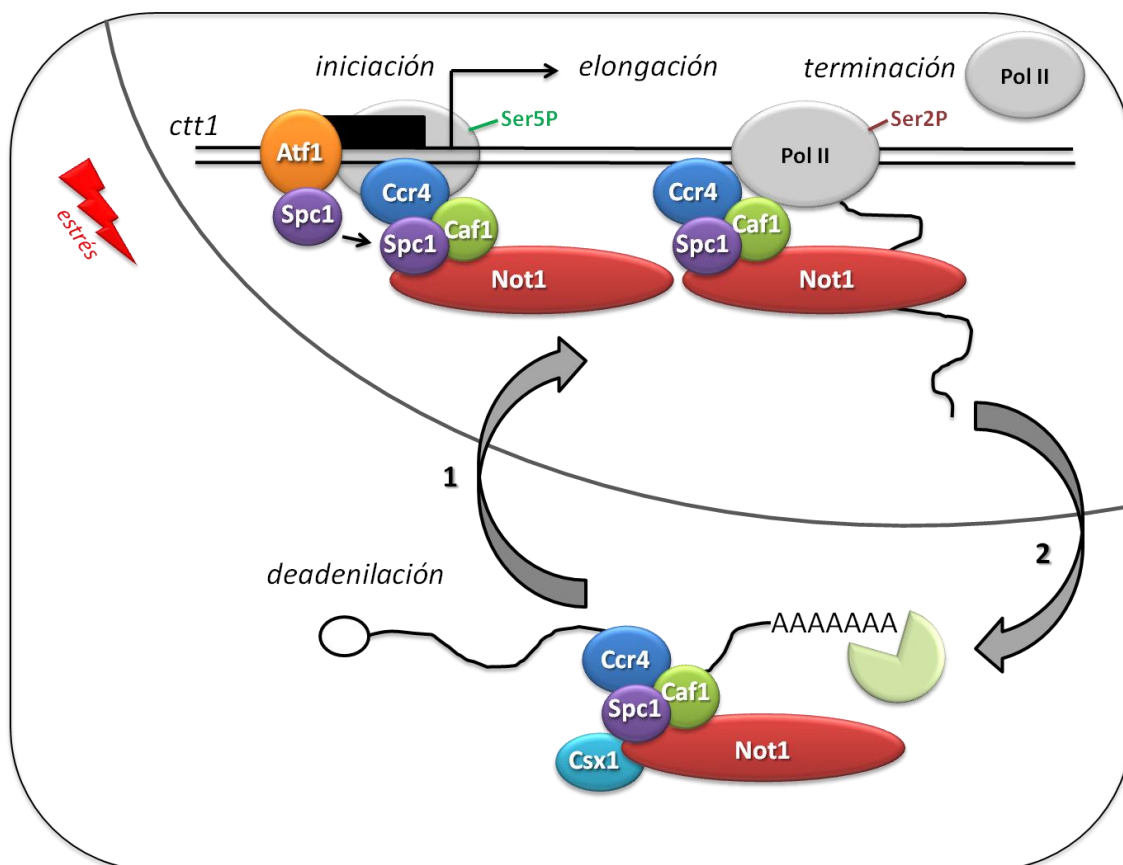


Figura 54. Modelo general del papel del complejo Ccr4-Not en la respuesta a estrés mediada por Spc1. Ejemplo sobre el gen *ctt1*. Luego del estrés, Spc1 se activa y transloca al núcleo y fosforila al factor de transcripción Atf1, se recluta también al complejo Ccr4-Not para regular la transcripción. De esta manera se inhibe la deadenilación en el citoplasma. En el núcleo, Atf1 se une a la zona promotora y Spc1 se mantiene unida al factor de transcripción. Ccr4 también se une a la zona promotora e interacciona con Spc1. Una vez iniciada la transcripción Spc1 participa en la elongación unida al complejo Ccr4-Not por Caf1, Ccr4 y Not1 que regula (mediante Caf1) el reclutamiento de Pol II y Pol II Ser2-P (fosforilada en la serina 2). El complejo se mantiene unido al transcritor mediante Ccr4 y Spc1 y se transloca junto a él al citoplasma donde Caf1 y Ccr4 actúan como deadenilasas. En el citoplasma Csx1 se une a Not1 en la región de unión del subcomplejo Spc1-Caf1-Ccr4 y regula la estabilidad de ARNm en estrés oxidativo. Este modelo también podría ser aplicable a la respuesta condiciones de *mating* y la regulación de Ste11. **1-** estrés osmótico y estrés oxidativo tratamiento corto (< 15min) **2-** estrés oxidativo tratamiento largo (> 15min).

5.1 Estudios de interacción genética

Por los estudios de interacción genética, hemos observado que en estrés oxidativo y osmótico hay interacción genética de Caf1 y Ccr4 con Spc1 en el fenotipo de sensibilidad. En estrés oxidativo hay supresión parcial del fenotipo de *spc1Δ* y en estrés osmótico las vías de Spc1, Caf1 y Ccr4 son complementarias dado que sus delecciones conjuntas empeoran el fenotipo (Fig. 28). Todavía desconocemos cómo está relacionado este fenotipo con la expresión

génica, pero por los resultados preliminares pareciera que no está relacionado a la expresión de genes inducidos por estrés (Fig. 30).

Además hemos encontrado que Caf1 presenta interacción genética a nivel de fenotipo de sensibilidad y transcripcional con Gcn5, un miembro del complejo SAGA necesaria para la respuesta a estrés oxidativo (Fig. 41-43). Gcn5 regula la elongación de genes inducidos por estrés de una manera Spc1 dependiente (Sanso *et al.* 2011b). La interacción genética sugiere que Caf1 participa de manera complementaria a Gcn5 y el mecanismo es similar al de esta proteína, regulando la unión de PolII a genes inducidos por estrés (Fig. 43). Cómo están relacionados el complejo SAGA (Gcn5 y Ada2 que interacciona con el complejo Ccr4-Not y con Spc1), con el complejo Ccr4-Not y la MAPK Spc1 es una pregunta interesante de estudiar.

5.2 ¿El complejo modifica post-traduccionamente a Spc1?

Por último, en búsqueda de los posibles nexos entre el complejo Ccr4-Not y Spc1, estudiamos las modificaciones post-traduccionales de Spc1 dado que el complejo participa en la modificación de otras proteínas. Encontramos que Spc1 se ubiquitina, que es una modificación de varias ubiquitinas y que en principio esta modificación no depende de la principal ubiquitin ligasa E3 del complejo Mot2. Sin embargo, el hallazgo de esta modificación es una línea interesante de estudio.

Realizamos la mutagénesis de cuatro lisinas posiblemente relevantes funcionalmente para la actividad de Spc1 pero no hemos podido encontrar el sitio de ubiquitinación ni el papel fisiológico de la ubiquitinación de Spc1. Sin embargo, una observación importante es la importancia de la función de la proteína además de por su actividad kinasa. Hemos observado que la mutación en la lisina 49 de Spc1 (ubicada en el sitio activo de la MAPK y que impide su actividad kinasa) presenta una sensibilidad a estrés menor a la cepa *spc1Δ* en condiciones de estrés oxidativo, osmótico, alta temperatura y en presencia de drogas de inhibición de la elongación, lo que concuerda con nuestra especulación de que Spc1 podría estar llevando a cabo un papel estructural además de su función como MAPK. También podría explicar la importancia de su interacción con el complejo Ccr4-Not al menos en ciertas condiciones como en la regulación de la elongación de la transcripción.

6. PERSPECTIVAS A FUTURO

En base a los resultados obtenidos en este trabajo y a la información disponible en la bibliografía, hemos construido un modelo sobre el posible papel del complejo Ccr4-Not en la respuesta a estrés y regulación de la diferenciación mediada por Spc1 (Fig. 3). Este modelo es el punto de partida para ampliar nuestro entendimiento sobre la conexión de la MAPK Spc1 con el complejo Ccr4-Not, el papel de ambos en la regulación transcripcional y post-transcripcional y de qué manera se coordinan estos procesos en los diferentes tipos de estrés.

Por lo tanto, en un corto plazo nos proponemos continuar con el estudio del papel del complejo en la respuesta a estrés oxidativo y osmótico a diferentes duraciones de tratamiento. Para ello estamos realizando ensayos de expresión para comprobar la diferencia en la regulación entre los dos estreses. En estrés oxidativo hemos observado la unión de la ARN polimerasa II al gen *ctt1* inducido por estrés en una cepa *caf1Δ*, y los resultados preliminares muestran que Caf1 es necesaria para la unión de PolII total y PolII fosforilada en Ser2 a tratamiento corto (menor a 15 min) y largo de estrés (mayor a 15 min), lo que implica que la transcripción estaría desregulada a tiempos cortos y largos de estrés.

Además estamos realizando ensayos con inhibidores de la transcripción (1-10 fenantrolina) para observar la estabilidad de genes inducidos por estrés en las cepas *caf1Δ* y *ccr4Δ*. De esta manera esperamos medir indirectamente si la estabilidad de los transcritos cambia con diferentes tipos y tiempos de estrés. Esperaríamos que si nuestro modelo es correcto, el defecto en *caf1* y *ccr4* genere que la transcripción esté desregulada en un principio y que luego los transcritos se acumulen por no ser degradados por la maquinaria de deadenilación que actuaría a tiempos mayores a 15 min de estrés, y por lo tanto observaríamos que su estabilidad sea mayor en el ensayo de inhibición de la transcripción.

Por último, en base a los resultados obtenidos, nos interesa estudiar el papel de Csx1 en el modelo planteado.

CONCLUSIONES

- La MAPK Spc1 y la proteína de unión a ARN Csx1 interaccionan con Not1 del complejo Ccr4-Not tanto en condiciones basales como de estrés oxidativo y osmótico
- Spc1 interacciona directamente con Not1 a través de la zona amino terminal de Not1 (aminoácidos 635-1117)
- La unión de Spc1 a Not1 está regulada por otros componentes y proteínas asociadas del complejo Ccr4-Not.
 - Spc1 interacciona con Caf1 y Ccr4.
 - La interacción de Spc1 con Not1 está favorecida por Caf1, Ccr4, Ada2 (SAGA), Btf3 (NAC), Srb10 (Mediador) y Csx1.
 - Las proteínas Mot2, Rcd1 y Caf16 interrumpen la unión de Spc1 con Not1.
- Los componentes del complejo Ccr4-Not son necesarios para la respuesta a estrés oxidativo, osmótico, alta temperatura y ausencia de nitrógeno en algunos de ellos de manera específica.
- Caf1 y Ccr4, junto a Spc1, regulan la respuesta transcripcional de defensa contra el estrés, principalmente a nivel de la elongación de la transcripción
- Spc1 no es necesaria para la integridad de la unión del subcomplejo Ccr4-Caf1-Not1
- Spc1 está ubiquitinada en condiciones basales y de estrés, y esta modificación no depende de la ubiquitin ligasa del complejo Ccr4-Not (Mot2) o de las subunidades Mts2 y Mts3 del proteasoma.
- La correcta respuesta a estrés no sólo necesita de la actividad kinasa de Spc1, sino también de la presencia de la proteína, aunque esté inactiva.

BIBLIOGRAFÍA

- Albert, T.K., Hanzawa, H., Legtenberg, Y.I., *et al.* (2002) Identification of a ubiquitin-protein ligase subunit within the CCR4-NOT transcription repressor complex. *The EMBO journal* **21**, 355-364.
- Albert, T.K., Lemaire, M., van Berkum, N.L., Gentz, R., Collart, M.A. & Timmers, H.T. (2000) Isolation and characterization of human orthologs of yeast CCR4-NOT complex subunits. *Nucleic acids research* **28**, 809-817.
- Andersen, K.R., Jonstrup, A.T., Van, L.B. & Brodersen, D.E. (2009) The activity and selectivity of fission yeast Pop2p are affected by a high affinity for Zn²⁺ and Mn²⁺ in the active site. *RNA (New York, N.Y)* **15**, 850-861.
- Asp, E. & Sunnerhagen, P. (2003) Mkp1 and Mkp2, two MAPKAP-kinase homologues in *Schizosaccharomyces pombe*, interact with the MAP kinase Sty1. *Mol Genet Genomics* **268**, 585-597.
- Azzouz, N., Panasenko, O.O., Colau, G. & Collart, M.A. (2009) The CCR4-NOT complex physically and functionally interacts with TRAMP and the nuclear exosome. *PloS one* **4**, e6760.
- Bahler, J., Wu, J.Q., Longtine, M.S., *et al.* (1998) Heterologous modules for efficient and versatile PCR-based gene targeting in *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast (Chichester, England)* **14**, 943-951.
- Bai, Y., Salvatore, C., Chiang, Y.C., Collart, M.A., Liu, H.Y. & Denis, C.L. (1999) The CCR4 and CAF1 proteins of the CCR4-NOT complex are physically and functionally separated from NOT2, NOT4, and NOT5. *Molecular and cellular biology* **19**, 6642-6651.
- Barba, G., Soto, T., Madrid, M., *et al.* (2008) Activation of the cell integrity pathway is channelled through diverse signalling elements in fission yeast. *Cellular signalling* **20**, 748-757.
- Bartlam, M. & Yamamoto, T. (2010) The structural basis for deadenylation by the CCR4-NOT complex. *Protein & cell* **1**, 443-452.
- Basi, G., Schmid, E. & Maundrell, K. (1993) TATA box mutations in the *Schizosaccharomyces pombe* nmt1 promoter affect transcription efficiency but not the transcription start point or thiamine repressibility. *Gene* **123**, 131-136.
- Basquin, J., Roudko, V.V., Rode, M., Basquin, C., Seraphin, B. & Conti, E. (2012) Architecture of the nuclease module of the yeast Ccr4-not complex: the Not1-Caf1-Ccr4 interaction. *Molecular cell* **48**, 207-218.
- Behm-Ansmant, I., Rehwinkel, J., Doerks, T., Stark, A., Bork, P. & Izaurralde, E. (2006) mRNA degradation by miRNAs and GW182 requires both CCR4:NOT deadenylase and DCP1:DCP2 decapping complexes. *Genes & development* **20**, 1885-1898.
- Beltrao, P., Trinidad, J.C., Fiedler, D., *et al.* (2009) Evolution of phosphoregulation: comparison of phosphorylation patterns across yeast species. *PLoS biology* **7**, e1000134.
- Benard, L. (2004) Inhibition of 5' to 3' mRNA degradation under stress conditions in *Saccharomyces cerevisiae*: from GCN4 to MET16. *RNA (New York, N.Y)* **10**, 458-468.
- Benson, J.D., Benson, M., Howley, P.M. & Struhl, K. (1998) Association of distinct yeast Not2 functional domains with components of Gcn5 histone acetylase and Ccr4 transcriptional regulatory complexes. *The EMBO journal* **17**, 6714-6722.
- Berlanga, J.J., Rivero, D., Martin, R., Herrero, S., Moreno, S. & de Haro, C. (2010) Role of mitogen-activated protein kinase Sty1 in regulation of eukaryotic initiation factor 2alpha kinases in response to environmental stress in *Schizosaccharomyces pombe*. *Eukaryotic cell* **9**, 194-207.
- Biswas, D., Yu, Y., Mitra, D. & Stillman, D.J. (2006) Genetic interactions between Nhp6 and Gcn5 with Mot1 and the Ccr4-Not complex that regulate binding of TATA-binding protein in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **172**, 837-849.

- Bogdan, J.A., Adams-Burton, C., Pedicord, D.L., *et al.* (1998) Human carbon catabolite repressor protein (CCR4)-associative factor 1: cloning, expression and characterization of its interaction with the B-cell translocation protein BTG1. *The Biochemical journal* **336** (Pt 2), 471-481.
- Buck, V., Quinn, J., Soto Pino, T., *et al.* (2001) Peroxide sensors for the fission yeast stress-activated mitogen-activated protein kinase pathway. *Molecular biology of the cell* **12**, 407-419.
- Calvo, I.A., Gabrielli, N., Iglesias-Baena, I., *et al.* (2009) Genome-wide screen of genes required for caffeine tolerance in fission yeast. *PloS one* **4**, e6619.
- Causton, H.C., Ren, B., Koh, S.S., *et al.* (2001) Remodeling of yeast genome expression in response to environmental changes. *Molecular biology of the cell* **12**, 323-337.
- Collart, M.A. (1996) The NOT, SPT3, and MOT1 genes functionally interact to regulate transcription at core promoters. *Molecular and cellular biology* **16**, 6668-6676.
- Collart, M.A. (2003) Global control of gene expression in yeast by the Ccr4-Not complex. *Gene* **313**, 1-16.
- Collart, M.A. & Panasenko, O.O. (2012) The Ccr4--not complex. *Gene* **492**, 42-53.
- Collart, M.A. & Struhl, K. (1993) CDC39, an essential nuclear protein that negatively regulates transcription and differentially affects the constitutive and inducible HIS3 promoters. *The EMBO journal* **12**, 177-186.
- Collart, M.A. & Struhl, K. (1994) NOT1(CDC39), NOT2(CDC36), NOT3, and NOT4 encode a global-negative regulator of transcription that differentially affects TATA-element utilization. *Genes & development* **8**, 525-537.
- Collart, M.A. & Timmers, H.T. (2004) The eukaryotic Ccr4-not complex: a regulatory platform integrating mRNA metabolism with cellular signaling pathways? *Progress in nucleic acid research and molecular biology* **77**, 289-322.
- Chen, D., Toone, W.M., Mata, J., *et al.* (2003) Global transcriptional responses of fission yeast to environmental stress. *Molecular biology of the cell* **14**, 214-229.
- Chen, J., Chiang, Y.C. & Denis, C.L. (2002) CCR4, a 3'-5' poly(A) RNA and ssDNA exonuclease, is the catalytic component of the cytoplasmic deadenylase. *The EMBO journal* **21**, 1414-1426.
- Chen, J., Rappsilber, J., Chiang, Y.C., Russell, P., Mann, M. & Denis, C.L. (2001) Purification and characterization of the 1.0 MDa CCR4-NOT complex identifies two novel components of the complex. *Journal of molecular biology* **314**, 683-694.
- Decottignies, A., Sanchez-Perez, I. & Nurse, P. (2003) Schizosaccharomyces pombe essential genes: a pilot study. *Genome research* **13**, 399-406.
- Degols, G. & Russell, P. (1997) Discrete roles of the Spc1 kinase and the Atf1 transcription factor in the UV response of Schizosaccharomyces pombe. *Molecular and cellular biology* **17**, 3356-3363.
- Deluen, C., James, N., Maillet, L., *et al.* (2002) The Ccr4-not complex and yTAF1 (yTaf(II)130p/yTaf(II)145p) show physical and functional interactions. *Molecular and cellular biology* **22**, 6735-6749.
- Dellavalle, R.P., Petersen, R. & Lindquist, S. (1994) Preferential deadenylation of Hsp70 mRNA plays a key role in regulating Hsp70 expression in Drosophila melanogaster. *Molecular and cellular biology* **14**, 3646-3659.
- Denis, C.L. & Chen, J. (2003) The CCR4-NOT complex plays diverse roles in mRNA metabolism. *Progress in nucleic acid research and molecular biology* **73**, 221-250.

- Denis, C.L., Chiang, Y.C., Cui, Y. & Chen, J. (2001) Genetic evidence supports a role for the yeast CCR4-NOT complex in transcriptional elongation. *Genetics* **158**, 627-634.
- Denis, C.L. & Malvar, T. (1990) The CCR4 gene from *Saccharomyces cerevisiae* is required for both nonfermentative and spt-mediated gene expression. *Genetics* **124**, 283-291.
- Deshpande, G.P., Hayles, J., Hoe, K.L., Kim, D.U., Park, H.O. & Hartsuiker, E. (2009) Screening a genome-wide *S. pombe* deletion library identifies novel genes and pathways involved in genome stability maintenance. *DNA repair* **8**, 672-679.
- Doidge, R., Mittal, S., Aslam, A. & Winkler, G.S. (2012) Deadenylation of cytoplasmic mRNA by the mammalian Ccr4-Not complex. *Biochemical Society transactions* **40**, 896-901.
- Dori-Bachash, M., Shema, E. & Tirosh, I. (2011) Coupled evolution of transcription and mRNA degradation. *PLoS biology* **9**, e1001106.
- Draper, M.P., Salvatore, C. & Denis, C.L. (1995) Identification of a mouse protein whose homolog in *Saccharomyces cerevisiae* is a component of the CCR4 transcriptional regulatory complex. *Molecular and cellular biology* **15**, 3487-3495.
- Dunand-Sauthier, I., Walker, C.A., Narasimhan, J., Pearce, A.K., Wek, R.C. & Humphrey, T.C. (2005) Stress-activated protein kinase pathway functions to support protein synthesis and translational adaptation in response to environmental stress in fission yeast. *Eukaryotic cell* **4**, 1785-1793.
- Dupressoir, A., Morel, A.P., Barbot, W., Loireau, M.P., Corbo, L. & Heidmann, T. (2001) Identification of four families of yCCR4- and Mg²⁺-dependent endonuclease-related proteins in higher eukaryotes, and characterization of orthologs of yCCR4 with a conserved leucine-rich repeat essential for hCAF1/hPOP2 binding. *BMC genomics* **2**, 9.
- Egel, R. (2004) The Molecular Biology of *Schizosaccharomyces pombe* Genetics, Genomics, and Beyond., Springer.
- Egloff, S. & Murphy, S. (2008) Cracking the RNA polymerase II CTD code. *Trends Genet* **24**, 280-288.
- Eshaghi, M., Lee, J.H., Zhu, L., *et al.* (2010) Genomic binding profiling of the fission yeast stress-activated MAPK Sty1 and the bZIP transcriptional activator Atf1 in response to H₂O₂. *PloS one* **5**, e11620.
- Eulalio, A., Huntzinger, E., Nishihara, T., Rehwinkel, J., Fauser, M. & Izaurralde, E. (2009) Deadenylation is a widespread effect of miRNA regulation. *RNA (New York, N.Y)* **15**, 21-32.
- Exinger, F. & Lacroute, F. (1992) 6-Azauracil inhibition of GTP biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Current genetics* **22**, 9-11.
- Fabian, M.R., Cieplak, M.K., Frank, F., *et al.* (2009) miRNA-mediated deadenylation is orchestrated by GW182 through two conserved motifs that interact with CCR4-NOT. *Nature structural & molecular biology* **18**, 1211-1217.
- Fabian, M.R., Frank, F., Rouya, C., *et al.* (2013) Structural basis for the recruitment of the human CCR4-NOT deadenylase complex by tristetraprolin. *Nature structural & molecular biology* **20**, 735-739.
- Fasolo, J., Sboner, A., Sun, M.G., *et al.* (2011) Diverse protein kinase interactions identified by protein microarrays reveal novel connections between cellular processes. *Genes & development* **25**, 767-778.
- Ficarro, S., Chertihin, O., Westbrook, V.A., *et al.* (2003) Phosphoproteome analysis of capacitated human sperm. Evidence of tyrosine phosphorylation of a kinase-anchoring protein 3 and valosin-containing protein/p97 during capacitation. *The Journal of biological chemistry* **278**, 11579-11589.

- Filipowicz, W., Bhattacharyya, S.N. & Sonenberg, N. (2008) Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nat Rev Genet* **9**, 102-114.
- Gaillard, H., Tous, C., Botet, J., *et al.* (2009) Genome-wide analysis of factors affecting transcription elongation and DNA repair: a new role for PAF and Ccr4-not in transcription-coupled repair. *PLoS genetics* **5**, e1000364.
- Gao, J., Wagon, J.L., Protacio, R.M., *et al.* (2013) A stress-activated, p38 MAPK-ATF/CREB pathway regulates post-transcriptional, sequence-dependent decay of target RNAs. *Molecular and cellular biology*.
- Gasch, A.P., Spellman, P.T., Kao, C.M., *et al.* (2000) Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes. *Molecular biology of the cell* **11**, 4241-4257.
- Gavin, A.C., Bosche, M., Krause, R., *et al.* (2002) Functional organization of the yeast proteome by systematic analysis of protein complexes. *Nature* **415**, 141-147.
- Godon, C., Lagniel, G., Lee, J., *et al.* (1998) The H2O2 stimulon in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of biological chemistry* **273**, 22480-22489.
- Goldstrohm, A.C., Seay, D.J., Hook, B.A. & Wickens, M. (2007) PUF protein-mediated deadenylation is catalyzed by Ccr4p. *The Journal of biological chemistry* **282**, 109-114.
- Gowrishankar, G., Winzen, R., Dittrich-Breiholz, O., Redich, N., Kracht, M. & Holtmann, H. (2006) Inhibition of mRNA deadenylation and degradation by different types of cell stress. *Biological chemistry* **387**, 323-327.
- Greatrix, B.W. & van Vuuren, H.J. (2006) Expression of the HXT13, HXT15 and HXT17 genes in *Saccharomyces cerevisiae* and stabilization of the HXT1 gene transcript by sugar-induced osmotic stress. *Current genetics* **49**, 205-217.
- Haimovich, G., Medina, D.A., Causse, S.Z., *et al.* (2013) Gene expression is circular: factors for mRNA degradation also foster mRNA synthesis. *Cell* **153**, 1000-1011.
- Hanahan, D. (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of molecular biology* **166**, 557-580.
- Helmlinger, D. (2012) New insights into the SAGA complex from studies of the Tra1 subunit in budding and fission yeast. *Transcription* **3**, 13-18.
- Helmlinger, D., Marguerat, S., Villen, J., Gygi, S.P., Bahler, J. & Winston, F. (2008) The *S. pombe* SAGA complex controls the switch from proliferation to sexual differentiation through the opposing roles of its subunits Gcn5 and Spt8. *Genes & development* **22**, 3184-3195.
- Helmlinger, D., Marguerat, S., Villen, J., *et al.* (2011) Tra1 has specific regulatory roles, rather than global functions, within the SAGA co-activator complex. *The EMBO journal* **30**, 2843-2852.
- Hentges, P., Van Driessche, B., Tafforeau, L., Vandenhoute, J. & Carr, A.M. (2005) Three novel antibiotic marker cassettes for gene disruption and marker switching in *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast (Chichester, England)* **22**, 1013-1019.
- Hershko, A. & Ciechanover, A. (1998) The ubiquitin system. *Annual review of biochemistry* **67**, 425-479.
- Hilgers, V., Teixeira, D. & Parker, R. (2006) Translation-independent inhibition of mRNA deadenylation during stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *RNA (New York, N.Y)* **12**, 1835-1845.
- Hoffman, C.S. & Winston, F. (1987) A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*. *Gene* **57**, 267-272.
- Ito, K., Takahashi, A., Morita, M., Suzuki, T. & Yamamoto, T. (2011) The role of the CNOT1 subunit of the CCR4-NOT complex in mRNA deadenylation and cell viability. *Protein & cell* **2**, 755-763.

- James, N., Landrieux, E. & Collart, M.A. (2007) A SAGA-independent function of SPT3 mediates transcriptional deregulation in a mutant of the Ccr4-not complex in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **177**, 123-135.
- Jeffrey, K.L., Camps, M., Rommel, C. & Mackay, C.R. (2007) Targeting dual-specificity phosphatases: manipulating MAP kinase signalling and immune responses. *Nature reviews* **6**, 391-403.
- Jeong, H.T., Ozoe, F., Tanaka, K., Nakagawa, T., Matsuda, H. & Kawamukai, M. (2004) A novel gene, *msa1*, inhibits sexual differentiation in *Schizosaccharomyces pombe*. *Genetics* **167**, 77-91.
- Jeske, M., Meyer, S., Temme, C., Freudenreich, D. & Wahle, E. (2006) Rapid ATP-dependent deadenylation of nanos mRNA in a cell-free system from *Drosophila* embryos. *The Journal of biological chemistry* **281**, 25124-25133.
- Johnson, G.L. & Lapadat, R. (2002) Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science (New York, N.Y)* **298**, 1911-1912.
- Jonstrup, A.T., Andersen, K.R., Van, L.B. & Brodersen, D.E. (2007) The 1.4-Å crystal structure of the *S. pombe* Pop2p deadenylase subunit unveils the configuration of an active enzyme. *Nucleic acids research* **35**, 3153-3164.
- Kang, W.H., Park, Y.D., Hwang, J.S. & Park, H.M. (2007) RNA-binding protein Csx1 is phosphorylated by LAMMER kinase, Lkh1, in response to oxidative stress in *Schizosaccharomyces pombe*. *FEBS letters* **581**, 3473-3478.
- Kato, T., Jr., Okazaki, K., Murakami, H., Stettler, S., Fantes, P.A. & Okayama, H. (1996) Stress signal, mediated by a Hog1-like MAP kinase, controls sexual development in fission yeast. *FEBS letters* **378**, 207-212.
- Kerr, S.C., Azzouz, N., Fuchs, S.M., *et al.* (2011) The Ccr4-Not complex interacts with the mRNA export machinery. *PloS one* **6**, e18302.
- Khodursky, A.B. & Bernstein, J.A. (2003) Life after transcription--revisiting the fate of messenger RNA. *Trends Genet* **19**, 113-115.
- Komarnitsky, S.I., Chiang, Y.C., Luca, F.C., *et al.* (1998) DBF2 protein kinase binds to and acts through the cell cycle-regulated MOB1 protein. *Molecular and cellular biology* **18**, 2100-2107.
- Kon, N., Schroeder, S.C., Krawchuk, M.D. & Wahls, W.P. (1998) Regulation of the Mts1-Mts2-dependent *ade6-M26* meiotic recombination hot spot and developmental decisions by the Spc1 mitogen-activated protein kinase of fission yeast. *Molecular and cellular biology* **18**, 7575-7583.
- Koutelou, E., Hirsch, C.L. & Dent, S.Y. (2010) Multiple faces of the SAGA complex. *Current opinion in cell biology* **22**, 374-382.
- Kruk, J.A., Dutta, A., Fu, J., Gilmour, D.S. & Reese, J.C. (2011) The multifunctional Ccr4-Not complex directly promotes transcription elongation. *Genes & development* **25**, 581-593.
- Laribee, R.N., Shibata, Y., Mersman, D.P., *et al.* (2007) CCR4/NOT complex associates with the proteasome and regulates histone methylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**, 5836-5841.
- Laroia, G., Cuesta, R., Brewer, G. & Schneider, R.J. (1999) Control of mRNA decay by heat shock-ubiquitin-proteasome pathway. *Science (New York, N.Y)* **284**, 499-502.
- Lawrence, C.L., Maekawa, H., Worthington, J.L., Reiter, W., Wilkinson, C.R. & Jones, N. (2007) Regulation of *Schizosaccharomyces pombe* Atf1 protein levels by Sty1-mediated phosphorylation and heterodimerization with Pcr1. *The Journal of biological chemistry* **282**, 5160-5170.

- Lee, D., Ezhkova, E., Li, B., Pattenden, S.G., Tansey, W.P. & Workman, J.L. (2005) The proteasome regulatory particle alters the SAGA coactivator to enhance its interactions with transcriptional activators. *Cell* **123**, 423-436.
- Lee, T.I., Wyrick, J.J., Koh, S.S., Jennings, E.G., Gadbois, E.L. & Young, R.A. (1998) Interplay of positive and negative regulators in transcription initiation by RNA polymerase II holoenzyme. *Molecular and cellular biology* **18**, 4455-4462.
- Lemaire, M. & Collart, M.A. (2000) The TATA-binding protein-associated factor yTafII19p functionally interacts with components of the global transcriptional regulator Ccr4-Not complex and physically interacts with the Not5 subunit. *The Journal of biological chemistry* **275**, 26925-26934.
- Lenissen, E., Azzouz, N., Michel, A., Landrieux, E. & Collart, M.A. (2007) The Ccr4-not complex regulates Skn7 through Srb10 kinase. *Eukaryotic cell* **6**, 2251-2259.
- Lenissen, E., Oberholzer, U., Labarre, J., De Virgilio, C. & Collart, M.A. (2002) *Saccharomyces cerevisiae* Ccr4-not complex contributes to the control of Msn2p-dependent transcription by the Ras/cAMP pathway. *Molecular microbiology* **43**, 1023-1037.
- Liu, H.Y., Badarinarayana, V., Audino, D.C., Rappsilber, J., Mann, M. & Denis, C.L. (1998) The NOT proteins are part of the CCR4 transcriptional complex and affect gene expression both positively and negatively. *The EMBO journal* **17**, 1096-1106.
- Liu, H.Y., Chiang, Y.C., Pan, J., *et al.* (2001) Characterization of CAF4 and CAF16 reveals a functional connection between the CCR4-NOT complex and a subset of SRB proteins of the RNA polymerase II holoenzyme. *The Journal of biological chemistry* **276**, 7541-7548.
- Liu, H.Y., Toyn, J.H., Chiang, Y.C., Draper, M.P., Johnston, L.H. & Denis, C.L. (1997) DBF2, a cell cycle-regulated protein kinase, is physically and functionally associated with the CCR4 transcriptional regulatory complex. *The EMBO journal* **16**, 5289-5298.
- Lopez-Aviles, S., Lambea, E., Moldon, A., *et al.* (2008) Activation of Srl1 by the mitogen-activated protein kinase Sty1/Spc1 precedes its dissociation from the kinase and signals its degradation. *Molecular biology of the cell* **19**, 1670-1679.
- Madrid, M., Fernandez-Zapata, J., Sanchez-Mir, L., *et al.* (2013) Role of the fission yeast cell integrity MAPK pathway in response to glucose limitation. *BMC microbiology* **13**, 34.
- Madrid, M., Nunez, A., Soto, T., Vicente-Soler, J., Gacto, M. & Cansado, J. (2007) Stress-activated protein kinase-mediated down-regulation of the cell integrity pathway mitogen-activated protein kinase Pmk1p by protein phosphatases. *Molecular biology of the cell* **18**, 4405-4419.
- Madrid, M., Soto, T., Khong, H.K., *et al.* (2006) Stress-induced response, localization, and regulation of the Pmk1 cell integrity pathway in *Schizosaccharomyces pombe*. *The Journal of biological chemistry* **281**, 2033-2043.
- Maeda, I., Kohara, Y., Yamamoto, M. & Sugimoto, A. (2001) Large-scale analysis of gene function in *Caenorhabditis elegans* by high-throughput RNAi. *Curr Biol* **11**, 171-176.
- Maillet, L. & Collart, M.A. (2002) Interaction between Not1p, a component of the Ccr4-not complex, a global regulator of transcription, and Dhh1p, a putative RNA helicase. *The Journal of biological chemistry* **277**, 2835-2842.
- Maillet, L., Tu, C., Hong, Y.K., Shuster, E.O. & Collart, M.A. (2000) The essential function of Not1 lies within the Ccr4-Not complex. *Journal of molecular biology* **303**, 131-143.
- Marchese, F.P., Aubareda, A., Tudor, C., Saklatvala, J., Clark, A.R. & Dean, J.L. (2010) MAPKAP kinase 2 blocks tristetraprolin-directed mRNA decay by inhibiting CAF1 deadenylase recruitment. *The Journal of biological chemistry* **285**, 27590-27600.

- Martin, V., Rodriguez-Gabriel, M.A., McDonald, W.H., *et al.* (2006) Cip1 and Cip2 are novel RNA-recognition-motif proteins that counteract Csx1 function during oxidative stress. *Molecular biology of the cell* **17**, 1176-1183.
- Matia-Gonzalez, A.M., Sotelo, J. & Rodriguez-Gabriel, M.A. (2012) The RNA binding protein Csx1 promotes sexual differentiation in *Schizosaccharomyces pombe*. *PloS one* **7**, e30067.
- Mersman, D.P., Du, H.N., Fingerman, I.M., South, P.F. & Briggs, S.D. (2009) Polyubiquitination of the demethylase Jhd2 controls histone methylation and gene expression. *Genes & development* **23**, 951-962.
- Millar, J.B., Buck, V. & Wilkinson, M.G. (1995) Pyp1 and Pyp2 PTPases dephosphorylate an osmosensing MAP kinase controlling cell size at division in fission yeast. *Genes & development* **9**, 2117-2130.
- Mitsuzawa, H. & Ishihama, A. (2004) RNA polymerase II transcription apparatus in *Schizosaccharomyces pombe*. *Current genetics* **44**, 287-294.
- Morel, A.P., Sentis, S., Bianchin, C., *et al.* (2003) BTG2 antiproliferative protein interacts with the human CCR4 complex existing in vivo in three cell-cycle-regulated forms. *Journal of cell science* **116**, 2929-2936.
- Moriya, H., Shimizu-Yoshida, Y., Omori, A., Iwashita, S., Katoh, M. & Sakai, A. (2001) Yak1p, a DYRK family kinase, translocates to the nucleus and phosphorylates yeast Pop2p in response to a glucose signal. *Genes & development* **15**, 1217-1228.
- Morozov, I.Y., Jones, M.G., Spiller, D.G., *et al.* (2010) Distinct roles for Caf1, Ccr4, Edc3 and CutA in the co-ordination of transcript deadenylation, decapping and P-body formation in *Aspergillus nidulans*. *Molecular microbiology* **76**, 503-516.
- Mulder, K.W., Brenkman, A.B., Inagaki, A., van den Broek, N.J. & Timmers, H.T. (2007) Regulation of histone H3K4 tri-methylation and PAF complex recruitment by the Ccr4-Not complex. *Nucleic acids research* **35**, 2428-2439.
- Mulder, K.W., Winkler, G.S. & Timmers, H.T. (2005) DNA damage and replication stress induced transcription of RNR genes is dependent on the Ccr4-Not complex. *Nucleic acids research* **33**, 6384-6392.
- Nasertorabi, F., Batisse, C., Diepholz, M., Suck, D. & Bottcher, B. (2011) Insights into the structure of the CCR4-NOT complex by electron microscopy. *FEBS letters* **585**, 2182-2186.
- Nemoto, N., Udagawa, T., Ohira, T., *et al.* The roles of stress-activated Sty1 and Gcn2 kinases and of the protooncprotein homologue Int6/eIF3e in responses to endogenous oxidative stress during histidine starvation. *Journal of molecular biology* **404**, 183-201.
- Nguyen, A.N., Lee, A., Place, W. & Shiozaki, K. (2000) Multistep phosphorelay proteins transmit oxidative stress signals to the fission yeast stress-activated protein kinase. *Molecular biology of the cell* **11**, 1169-1181.
- Nguyen, A.N. & Shiozaki, K. (1999) Heat-shock-induced activation of stress MAP kinase is regulated by threonine- and tyrosine-specific phosphatases. *Genes & development* **13**, 1653-1663.
- Oberholzer, U. & Collart, M.A. (1998) Characterization of NOT5 that encodes a new component of the Not protein complex. *Gene* **207**, 61-69.
- Okazaki, K., Okazaki, N., Kume, K., Jinno, S., Tanaka, K. & Okayama, H. (1990) High-frequency transformation method and library transducing vectors for cloning mammalian cDNAs by trans-complementation of *Schizosaccharomyces pombe*. *Nucleic acids research* **18**, 6485-6489.

- Okazaki, N., Okazaki, K., Watanabe, Y., Kato-Hayashi, M., Yamamoto, M. & Okayama, H. (1998) Novel factor highly conserved among eukaryotes controls sexual development in fission yeast. *Molecular and cellular biology* **18**, 887-895.
- Oowatari, Y., Jeong, H., Tanae, K., Nakagawa, T. & Kawamukai, M. (2011) Regulation and role of an RNA-binding protein Msa2 in controlling the sexual differentiation of fission yeast. *Current genetics* **57**, 191-200.
- Panasenko, O.O. & Collart, M.A. (2011) Presence of Not5 and ubiquitinated Rps7A in polysome fractions depends upon the Not4 E3 ligase. *Molecular microbiology* **83**, 640-653.
- Parker, R. (2012) RNA degradation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **191**, 671-702.
- Pascual-Ahuir, A., Struhl, K. & Proft, M. (2006) Genome-wide location analysis of the stress-activated MAP kinase Hog1 in yeast. *Methods (San Diego, Calif)* **40**, 272-278.
- Peng, W., Togawa, C., Zhang, K. & Kurdistani, S.K. (2008) Regulators of cellular levels of histone acetylation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **179**, 277-289.
- Perez-Ortin, J.E., de Miguel-Jimenez, L. & Chavez, S. (2012) Genome-wide studies of mRNA synthesis and degradation in eukaryotes. *Biochimica et biophysica acta* **1819**, 604-615.
- Perez, P. & Rincon, S.A. (2010) Rho GTPases: regulation of cell polarity and growth in yeasts. *The Biochemical journal* **426**, 243-253.
- Peters, J.M. (1998) SCF and APC: the Yin and Yang of cell cycle regulated proteolysis. *Current opinion in cell biology* **10**, 759-768.
- Petit, A.P., Wohlbald, L., Bawankar, P., *et al.* (2012) The structural basis for the interaction between the CAF1 nuclease and the NOT1 scaffold of the human CCR4-NOT deadenylase complex. *Nucleic acids research* **40**, 11058-11072.
- Phatnani, H.P. & Greenleaf, A.L. (2006) Phosphorylation and functions of the RNA polymerase II CTD. *Genes & development* **20**, 2922-2936.
- Pokholok, D.K., Zeitlinger, J., Hannett, N.M., Reynolds, D.B. & Young, R.A. (2006) Activated signal transduction kinases frequently occupy target genes. *Science (New York, N.Y)* **313**, 533-536.
- Proft, M., Mas, G., de Nadal, E., *et al.* (2006) The stress-activated Hog1 kinase is a selective transcriptional elongation factor for genes responding to osmotic stress. *Molecular cell* **23**, 241-250.
- Quinn, J., Findlay, V.J., Dawson, K., *et al.* (2002) Distinct regulatory proteins control the graded transcriptional response to increasing H₂O₂ levels in fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Molecular biology of the cell* **13**, 805-816.
- Reese, J.C. (2012) The control of elongation by the yeast Ccr4-not complex. *Biochimica et biophysica acta* **1829**, 127-133.
- Reiter, W., Watt, S., Dawson, K., *et al.* (2008) Fission yeast MAP kinase Sty1 is recruited to stress-induced genes. *The Journal of biological chemistry* **283**, 9945-9956.
- Ries, D. & Meisterernst, M. (2011) Control of gene transcription by Mediator in chromatin. *Seminars in cell & developmental biology* **22**, 735-740.
- Rodriguez-Gabriel, M.A., Burns, G., McDonald, W.H., *et al.* (2003) RNA-binding protein Csx1 mediates global control of gene expression in response to oxidative stress. *The EMBO journal* **22**, 6256-6266.
- Rodriguez-Gabriel, M.A. & Russell, P. (2005) Distinct signaling pathways respond to arsenite and reactive oxygen species in *Schizosaccharomyces pombe*. *Eukaryotic cell* **4**, 1396-1402.

- Rodriguez-Gil, A., Garcia-Martinez, J., Pelechano, V., *et al.* (2010) The distribution of active RNA polymerase II along the transcribed region is gene-specific and controlled by elongation factors. *Nucleic acids research* **38**, 4651-4664.
- Rospert, S., Dubaquier, Y. & Gautschi, M. (2002) Nascent-polypeptide-associated complex. *Cell Mol Life Sci* **59**, 1632-1639.
- Rougemaille, M. & Libri, D. (2010) Control of cryptic transcription in eukaryotes. *Advances in experimental medicine and biology* **702**, 122-131.
- Sabatinos, S.A. & Forsburg, S.L. (2010). Molecular genetics of *Schizosaccharomyces pombe*. *Methods in enzymology* **470**, 759-795.
- Sakai, A., Chibazakura, T., Shimizu, Y. & Hishinuma, F. (1992) Molecular analysis of POP2 gene, a gene required for glucose-derepression of gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic acids research* **20**, 6227-6233.
- Sambrook, J. & Russell, D.W. (2006a) Agarose gel electrophoresis. *CSH protocols* **2006**.
- Sambrook, J. & Russell, D.W. (2006b) The Hanahan Method for Preparation and Transformation of Competent *E. coli*: High-efficiency Transformation. *CSH protocols* **2006**.
- Sambrook, J. & Russell, D.W. (2006c) SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis of Proteins. *CSH protocols* **2006**.
- Samejima, I., Mackie, S. & Fantes, P.A. (1997) Multiple modes of activation of the stress-responsive MAP kinase pathway in fission yeast. *The EMBO journal* **16**, 6162-6170.
- Samejima, I., Mackie, S., Warbrick, E., Weisman, R. & Fantes, P.A. (1998) The fission yeast mitotic regulator *win1+* encodes an MAP kinase kinase kinase that phosphorylates and activates *Wis1* MAP kinase kinase in response to high osmolarity. *Molecular biology of the cell* **9**, 2325-2335.
- Sanchez-Piris, M., Posas, F., Alemany, V., *et al.* (2002) The serine/threonine kinase *Cmk2* is required for oxidative stress response in fission yeast. *The Journal of biological chemistry* **277**, 17722-17727.
- Sanders, S.L., Jennings, J., Canutescu, A., Link, A.J. & Weil, P.A. (2002) Proteomics of the eukaryotic transcription machinery: identification of proteins associated with components of yeast TFIID by multidimensional mass spectrometry. *Molecular and cellular biology* **22**, 4723-4738.
- Sandler, H., Kreth, J., Timmers, H.T. & Stoecklin, G. (2011) Not1 mediates recruitment of the deadenylase Caf1 to mRNAs targeted for degradation by tristetraprolin. *Nucleic acids research* **39**, 4373-4386.
- Sanger, F., A., *et al.* (1980) Cloning in single-stranded bacteriophage as an aid to rapid DNA sequencing *J. Mol. Biol.* **143**, 161- 178
- Sanso, M., Gogol, M., Ayte, J., Seidel, C. & Hidalgo, E. (2008) Transcription factors Pcr1 and Atf1 have distinct roles in stress- and Sty1-dependent gene regulation. *Eukaryotic cell* **7**, 826-835.
- Sanso, M., Vargas-Perez, I., Garcia, P., Ayte, J. & Hidalgo, E. (2011a) Nuclear roles and regulation of chromatin structure by the stress-dependent MAP kinase Sty1 of *Schizosaccharomyces pombe*. *Molecular microbiology* **82**, 542-554.
- Sanso, M., Vargas-Perez, I., Quintales, L., Antequera, F., Ayte, J. & Hidalgo, E. (2011b) Gcn5 facilitates Pol II progression, rather than recruitment to nucleosome-depleted stress promoters, in *Schizosaccharomyces pombe*. *Nucleic acids research* **39**, 6369-6379.
- Schild, D. (1995) Suppression of a new allele of the yeast *RAD52* gene by overexpression of *RAD51*, mutations in *srs2* and *ccr4*, or mating-type heterozygosity. *Genetics* **140**, 115-127.

- Schwalb, B., Schulz, D., Sun, M., *et al.* (2012) Measurement of genome-wide RNA synthesis and decay rates with Dynamic Transcriptome Analysis (DTA). *Bioinformatics (Oxford, England)* **28**, 884-885.
- Schwede, A., Ellis, L., Luther, J., Carrington, M., Stoecklin, G. & Clayton, C. (2008) A role for Caf1 in mRNA deadenylation and decay in trypanosomes and human cells. *Nucleic acids research* **36**, 3374-3388.
- Sean M. O'Rourke, I.H.a.E.K.O.S. (2002) Yeast go the whole HOG for the hyperosmotic response. *TRENDS in Genetics* **18**, 8.
- Seufert, W. & Jentsch, S. (1990) Ubiquitin-conjugating enzymes UBC4 and UBC5 mediate selective degradation of short-lived and abnormal proteins. *The EMBO journal* **9**, 543-550.
- Shalem, O., Groisman, B., Choder, M., Dahan, O. & Pilpel, Y. (2011) Transcriptome kinetics is governed by a genome-wide coupling of mRNA production and degradation: a role for RNA Pol II. *PLoS genetics* **7**, e1002273.
- Shi, J. & Nelson, M.A. (2005) The cyclin-dependent kinase 11 interacts with NOT2. *Biochemical and biophysical research communications* **334**, 1310-1316.
- Shieh, J.C., Wilkinson, M.G., Buck, V., Morgan, B.A., Makino, K. & Millar, J.B. (1997) The Mcs4 response regulator coordinately controls the stress-activated Wak1-Wis1-Sty1 MAP kinase pathway and fission yeast cell cycle. *Genes & development* **11**, 1008-1022.
- Shieh, J.C., Wilkinson, M.G. & Millar, J.B. (1998) The Win1 mitotic regulator is a component of the fission yeast stress-activated Sty1 MAPK pathway. *Molecular biology of the cell* **9**, 311-322.
- Shiozaki, K. & Russell, P. (1995a) Cell-cycle control linked to extracellular environment by MAP kinase pathway in fission yeast. *Nature* **378**, 739-743.
- Shiozaki, K. & Russell, P. (1995b) Counteractive roles of protein phosphatase 2C (PP2C) and a MAP kinase kinase homolog in the osmoregulation of fission yeast. *The EMBO journal* **14**, 492-502.
- Shiozaki, K. & Russell, P. (1996) Conjugation, meiosis, and the osmotic stress response are regulated by Spc1 kinase through Atf1 transcription factor in fission yeast. *Genes & development* **10**, 2276-2288.
- Shiozaki, K., Shiozaki, M. & Russell, P. (1997) Mcs4 mitotic catastrophe suppressor regulates the fission yeast cell cycle through the Wik1-Wis1-Spc1 kinase cascade. *Molecular biology of the cell* **8**, 409-419.
- Shiozaki, K., Shiozaki, M. & Russell, P. (1998) Heat stress activates fission yeast Spc1/Sty1 MAPK by a MEKK-independent mechanism. *Molecular biology of the cell* **9**, 1339-1349.
- Smith, D.A., Toone, W.M., Chen, D., *et al.* (2002) The Srk1 protein kinase is a target for the Sty1 stress-activated MAPK in fission yeast. *The Journal of biological chemistry* **277**, 33411-33421.
- Soto, T., Nunez, A., Madrid, M., Vicente, J., Gacto, M. & Cansado, J. (2007) Transduction of centrifugation-induced gravity forces through mitogen-activated protein kinase pathways in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Microbiology (Reading, England)* **153**, 1519-1529.
- Spahr, H., Beve, J., Larsson, T., Bergstrom, J., Karlsson, K.A. & Gustafsson, C.M. (2000) Purification and characterization of RNA polymerase II holoenzyme from *Schizosaccharomyces pombe*. *The Journal of biological chemistry* **275**, 1351-1356.
- Suganuma, T. & Workman, J.L (2011). Signals and combinatorial functions of histone modifications. *Annual review of biochemistry* **80**, 473-499.

- Sun, M., Schwalb, B., Schulz, D., *et al.* (2012) Comparative dynamic transcriptome analysis (cDTA) reveals mutual feedback between mRNA synthesis and degradation. *Genome research* **22**, 1350-1359.
- Sunnerhagen, P. (1993) PCR used to determine mating type in *S. pombe*. *BioTechniques* **14**, 18.
- Swanson, M.J., Qiu, H., Sumibcay, L., *et al.* (2003) A multiplicity of coactivators is required by Gcn4p at individual promoters in vivo. *Molecular and cellular biology* **23**, 2800-2820.
- Takada, H., Nishida, A., Domae, M., *et al.* (2010) The cell surface protein gene *ecm33+* is a target of the two transcription factors Atf1 and Mbx1 and negatively regulates Pmk1 MAPK cell integrity signaling in fission yeast. *Molecular biology of the cell* **21**, 674-685.
- Takahashi, S., Kontani, K., Araki, Y. & Katada, T. (2007) Caf1 regulates translocation of ribonucleotide reductase by releasing nucleoplasmic Spd1-Suc22 assembly. *Nucleic acids research* **35**, 1187-1197.
- Takeda, K. & Yanagida, M. (2005) Regulation of nuclear proteasome by Rhp6/Ubc2 through ubiquitination and destruction of the sensor and anchor Cut8. *Cell* **122**, 393-405.
- Takeda, T., Toda, T., Kominami, K., Kohnosu, A., Yanagida, M. & Jones, N. (1995) *Schizosaccharomyces pombe atf1+* encodes a transcription factor required for sexual development and entry into stationary phase. *The EMBO journal* **14**, 6193-6208.
- Tange, Y., Kurabayashi, A., Goto, B., *et al.* (2012) The CCR4-NOT complex is implicated in the viability of aneuploid yeasts. *PLoS genetics* **8**, e1002776.
- Tansey, W.P. (2006) 6-azauracil sensitivity assay for yeast. *CSH protocols* **2006**.
- Tatebe, H. & Shiozaki, K. (2003) Identification of Cdc37 as a novel regulator of the stress-responsive mitogen-activated protein kinase. *Molecular and cellular biology* **23**, 5132-5142.
- Temme, C., Zaessinger, S., Meyer, S., Simonelig, M. & Wahle, E. (2004) A complex containing the CCR4 and CAF1 proteins is involved in mRNA deadenylation in *Drosophila*. *The EMBO journal* **23**, 2862-2871.
- Tibbles, L.A. & Woodgett, J.R. (1999) The stress-activated protein kinase pathways. *Cell Mol Life Sci* **55**, 1230-1254.
- Todeschini, A.L., Condon, C. & Benard, L. (2006) Sodium-induced GCN4 expression controls the accumulation of the 5' to 3' RNA degradation inhibitor, 3'-phosphoadenosine 5'-phosphate. *The Journal of biological chemistry* **281**, 3276-3282.
- Towbin, H., Staehelin, T. & Gordon, J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **76**, 4350-4354.
- Traven, A., Hammet, A., Tennis, N., Denis, C.L. & Heierhorst, J. (2005) Ccr4-not complex mRNA deadenylase activity contributes to DNA damage responses in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **169**, 65-75.
- Tsukahara, K., Yamamoto, H. & Okayama, H. (1998) An RNA binding protein negatively controlling differentiation in fission yeast. *Molecular and cellular biology* **18**, 4488-4498.
- Tucker, M., Staples, R.R., Valencia-Sanchez, M.A., Muhlrads, D. & Parker, R. (2002) Ccr4p is the catalytic subunit of a Ccr4p/Pop2p/Notp mRNA deadenylase complex in *Saccharomyces cerevisiae*. *The EMBO journal* **21**, 1427-1436.
- Tucker, M., Valencia-Sanchez, M.A., Staples, R.R., Chen, J., Denis, C.L. & Parker, R. (2001) The transcription factor associated Ccr4 and Caf1 proteins are components of the major cytoplasmic mRNA deadenylase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell* **104**, 377-386.
- Venters, B.J., Wachi, S., Mavrich, T.N., *et al.* (2011) A comprehensive genomic binding map of gene and chromatin regulatory proteins in *Saccharomyces*. *Molecular cell* **41**, 480-492.

- Viswanathan, P., Chen, J., Chiang, Y.C. & Denis, C.L. (2003) Identification of multiple RNA features that influence CCR4 deadenylation activity. *The Journal of biological chemistry* **278**, 14949-14955.
- Viswanathan, P., Ohn, T., Chiang, Y.C., Chen, J. & Denis, C.L. (2004) Mouse CAF1 can function as a processive deadenylase/3'-5'-exonuclease in vitro but in yeast the deadenylase function of CAF1 is not required for mRNA poly(A) removal. *The Journal of biological chemistry* **279**, 23988-23995.
- Vivancos, A.P., Castillo, E.A., Jones, N., Ayte, J. & Hidalgo, E. (2004) Activation of the redox sensor Pap1 by hydrogen peroxide requires modulation of the intracellular oxidant concentration. *Molecular microbiology* **52**, 1427-1435.
- Wahle, E. & Winkler, G.S. (2013) RNA decay machines: Deadenylation by the Ccr4-Not and Pan2-Pan3 complexes. *Biochimica et biophysica acta* **1829**, 561-570.
- Watanabe, Y. & Yamamoto, M. (1994) *S. pombe* mei2⁺ encodes an RNA-binding protein essential for premeiotic DNA synthesis and meiosis I, which cooperates with a novel RNA species meiRNA. *Cell* **78**, 487-498.
- Wiederhold, K. & Passmore, L.A. (2010) Cytoplasmic deadenylation: regulation of mRNA fate. *Biochemical Society transactions* **38**, 1531-1536.
- Wilkinson, M.G., Samuels, M., Takeda, T., *et al.* (1996) The Atf1 transcription factor is a target for the Sty1 stress-activated MAP kinase pathway in fission yeast. *Genes & development* **10**, 2289-2301.
- Wilson-Grady, J.T., Villen, J. & Gygi, S.P. (2008) Phosphoproteome analysis of fission yeast. *Journal of proteome research* **7**, 1088-1097.
- Wood, V., Gwilliam, R., Rajandream, M.A., *et al.* (2002) The genome sequence of *Schizosaccharomyces pombe*. *Nature* **415**, 871-880.
- Woychik, N.A. & Hampsey, M. (2002) The RNA polymerase II machinery: structure illuminates function. *Cell* **108**, 453-463.
- Zekri, L., Huntzinger, E., Heimstadt, S. & Izaurralde, E. (2009) The silencing domain of GW182 interacts with PABPC1 to promote translational repression and degradation of microRNA targets and is required for target release. *Molecular and cellular biology* **29**, 6220-6231.
- Zhang, X., Virtanen, A. & Kleiman, F.E. (2010) To polyadenylate or to deadenylate: that is the question. *Cell cycle (Georgetown, Tex)* **9**, 4437-4449.
- Zhao, M., Tang, D., Lechpammer, S., *et al.* (2002) Double-stranded RNA-dependent protein kinase (pkr) is essential for thermotolerance, accumulation of HSP70, and stabilization of ARE-containing HSP70 mRNA during stress. *The Journal of biological chemistry* **277**, 44539-44547.
- Zheng, L., Baumann, U. & Reymond, J.L. (2004) An efficient one-step site-directed and site-saturation mutagenesis protocol. *Nucleic acids research* **32**, e115.

